

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## A PROPOS DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE DÉTERMINATION SANS OBSERVATION DIRECTE DU DIAMÈTRE PARTICULAIRE ET DE LA CONSTANCE DE SÉDIMENTATION (\*)

par P. LÉPINE et J. GIUNTINI.

Dans une récente séance, P. Bonét-Maury (1) a rapporté d'intéressantes expériences, où, utilisant le rayonnement  $\alpha$  du radon, il attribue au virus de la fièvre aphteuse un diamètre (section efficace), voisin de celui de la molécule d'hémocyanine, compris entre 20 et 40  $\mu\mu$ , soit en moyenne 30  $\mu\mu$ . Comme le fait remarquer Bonét-Maury lui-même, ces chiffres sont sensiblement supérieurs aux dimensions classiquement admises d'après d'autres méthodes d'estimation de la taille des particules, en particulier d'après l'ultrafiltration.

Notre objet n'est pas de faire la critique de ces expériences, mais à l'occasion des résultats qu'elles rapportent, il nous semble intéressant de donner les valeurs des dimensions particulières du virus de la fièvre aphteuse auxquelles nous conduisent nos expériences d'ultracentrifugation (celles-ci s'intégrant dans un programme d'ensemble de recherches sur les ultravirus) et de comparer nos résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs, spécialement avec ceux qui ont employé différentes méthodes de centrifugation.

(\*) Communication présentée à la séance du 4 mars 1943 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

(1) P. BONÉT-MAURY, ces *Annales*, 1943, 69, 22.



Rappelons que ce sont les recherches au moyen de la filtration sur membranes graduées d'Elford qui ont donné les premières précisions sur la taille du virus aphteux, considéré comme le plus petit des ultravirus pathogènes pour les animaux. Les dimensions qui lui ont été attribuées par l'ultrafiltration sont de : 8 à 12 m $\mu$  [Galloway et Elford (2)], 3 à 5 m $\mu$  [Levaditi et coll. (3)], 7 à 16 m $\mu$  [Krassnoff et Reinié (4)], soit en moyenne environ 10 m $\mu$ .

La centrifugation a été pour la première fois appliquée à la détermination de la taille du virus aphteux par Busch (5), qui conclut de ses essais (absence de sédimentation après quatre heures à 10.000 tours) que le virus a une taille certainement inférieure à 30 m $\mu$ . Il donne d'autre part au virus une densité de 1,10, que l'on peut aujourd'hui considérer comme certainement trop faible, d'où une taille apparente exagérée. Cette absence de données précises sur le poids spécifique du virus est restée la pierre d'achoppement des méthodes de centrifugation.

Schlesinger et Galloway (6) ont fait les premières tentatives de détermination de la densité du virus aphteux en le centrifugeant dans des solutions concentrées de saccharose. Ils trouvent que le virus sédimente encore dans des solutions ayant des densités de 1,28 et concluent de leurs essais que le poids spécifique des particules virulentes est d'environ 1,40. Toutefois, tenant compte de ce chiffre élevé et de l'action déshydratante du milieu concentré, ils pensent que la densité réelle doit se trouver aux environs de 1,30. Employant pour leurs recherches la supercentrifuge Sharpless, leurs calculs leur donnent un diamètre particulière de 20 m $\mu$  (par le calcul de la vitesse de sédimentation : valeurs extrêmes : 16 à 23 m $\mu$ ) pour une densité de 1,30, qu'il faudrait réduire à 17 m $\mu$  (valeurs extrêmes : 14 à 20 m $\mu$ ) pour une densité de 1,40. Par la méthode de l'équilibre de sédimentation, ils trouvent, pour une densité de 1,30, une taille particulière de 25 m $\mu$ . La différence entre les deux diamètres (17 et 25 m $\mu$ ) calculés par les deux méthodes pour une même densité (1,30) leur paraît significative indépendamment des conditions de l'expérience, et due à ce que le virus présenterait une forme autre que la forme sphérique requise pour l'application exacte de la formule de Stokes.

Elford et Galloway (7) ont employé la méthode de centrifugation du « capillaire inversé ». Ils estiment, d'après leurs expériences, que la densité du virus doit être voisine de 1,30, ce qui les conduit

(2) I. A. GALLOWAY et W. J. ELFORD, *Brit. J. exp. Path.*, 1936, **17**, 187.

(3) C. LEVADITI, M. PAÏC, D. KRASSNOFF et J. VOET, *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 619.

(4) D. KRASSNOFF et L. REINIÉ, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 790.

(5) G. BUSCH, *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1934, **82**, 170.

(6) M. SCHLESINGER et I. A. GALLOWAY, *J. Hyg.*, 1937, **37**, 445.

(7) W. J. ELFORD et I. A. GALLOWAY, *Brit. J. exp. Path.*, 1937, **18**, 155.



à attribuer au diamètre de la particule virulente une valeur de 20  $m\mu$ .

Dans l'ensemble, par conséquent, les résultats de l'ultracentrifugation conduisent à attribuer à la taille du virus aphteux *une valeur d'environ 20  $m\mu$* , soit le double de celle trouvée par l'ultrafiltration.

Plus récemment, L. W. Janssen (8), opérant sur la protéine purifiée du virus aphteux, et travaillant dans des conditions qui paraissent excellentes, au moyen de l'ultracentrifugeuse à système d'observation de Svedberg, trouve que la protéine virulente présente une constante de sédimentation à 20° de 17 ou  $18.10^{-13}$  (protéine très purifiée) à  $21.10^{-13}$  (protéine moins purifiée), ce qui correspond à des tailles particulières sensiblement plus petites que celles calculées à partir du virus total, puisque les chiffres de Janssen conduisent à un poids moléculaire de 500.000 à 1.000.000, alors que ceux que l'on peut tirer des chiffres de centrifugation cités plus haut vont de 4 à 6 millions environ.

Nous passons sous silence les résultats obtenus par la micrographie, soit en rayons ultraviolets, soit en lumière électronique, leurs données étant encore par trop imprécises.

Nos essais ont été pratiqués en prenant pour terme de comparaison, en vue de la détermination du rapport  $C_u/C_o$ , d'une part, l'appauvrissement d'une suspension virulente en fonction du temps de centrifugation, et d'autre part la dilution du virus effectuée sur une suspension témoin. Nous avons employé la souche Vallée type O, due à l'obligeance de M. Verge. Les inoculations étaient faites à la patte du cobaye, les animaux observés et éprouvés dans les conditions classiques. Les centrifugations ont été effectuées au moyen de l'appareillage précédemment décrit (9); les tubes employés étaient des tubes en aluminium à 3 cavités parallèles capillaires de 2 mm. de diamètre et d'une longueur de 20 mm., le prélèvement terminal étant pratiqué sur une hauteur de 7 mm. Toutes les centrifugations ont été faites à la vitesse de 75.000 tours. Les résultats peuvent être résumés dans le tableau ci-après.

Il ressort de ce tableau que la virulence de l'émulsion originelle n'a pas diminué au bout de trente minutes de centrifugation, qu'elle s'abaisse à environ 50 p. 100 au bout de quarante minutes, et qu'après quarante-cinq minutes il ne reste plus assez de virus dans les 7 mm. surnageant la colonne capillaire pour déterminer chez le cobaye l'apparition d'une vésicule aphteuse.

Par comparaison avec les épreuves faites sur les témoins au moyen d'émulsions diluées, on constate que la dilution  $10^{-4}$  du

(8) L. W. JANSSEN, *Naturwiss.*, 1941, **29**, 102.

(9) P. LÉPINE, P. NICOLLE et J. GIUNTINI, ces *Annales*, 1942, **68**, 503.

TABLEAU I.

VIRUS CENTRIFUGÉ à 75.000 t./m.		ÉMULSION TÉMOIN Virus dilué	
Temps (minutes)	Virulenee à $10^{-4}$	Dilution	Virulence
30	++	$10^{-4}$	++
40	+—	$10^{-5}$	+—
45	—	$10^{-6}$	—
60	—	$10^{-7}$	—

*Nota* : Chaque signe correspond à un cobaye (+, une ou plusieurs vésicules; —, pas de réaction ni d'immunité consécutive). Chaque cobaye reçoit le produit inoculé en plusieurs points des régions plantaires, injectés simultanément.

virus est constamment virulente ; la dilution  $10^{-5}$  est infectante pour 1 cobaye sur 2 ; la dilution  $10^{-6}$  n'est plus virulente. On voit donc que la centrifugation de quarante minutes produit un effet comparable à une dilution de l'émulsion originelle à  $10^{-1}$  et que ce temps de centrifugation réalisant une réduction de virulence correspondant à un  $C_t/C_0$  de 0,1 doit être pris pour base des calculs. Ceux-ci sont résumés dans le tableau II.

TABLEAU II.

Eléments constants : $a = 0,75$ $h = 7$ $\sigma p = \begin{cases} 1,30 \\ 1,17 \end{cases}$ $\sigma m = 1.$ Eléments variables : $\theta^\circ = 24^\circ$ $\gamma_{24^\circ} = 0,00916$ $N = 75.000 \text{ t./m.}$ Temps (minutes), 40; démarrage, 3; arrêt, 4,5; temps corrigé, 42,5.				
$C_t/C_0$	$\log. \frac{a + h}{a + HC_t/C_0}$		$\log. d.$	$d$
0,1 . . . . .	0,24756	$\sigma p = \begin{cases} 1,30 \\ 1,17 \end{cases}$	$\begin{matrix} 1,14965 \\ 1,27422 \end{matrix}$	$\begin{matrix} 14 \text{ m}\mu. \\ 19 \text{ m}\mu. \end{matrix}$

Rappelons que ceux-ci se font selon la formule d'Elford, dont on trouvera dans une de nos publications antérieures (9) l'énoncé et la définition des symboles. Les circonstances présentes nous ont empêchés d'appliquer au virus aphteux le mode de détermination du poids spécifique par centrifugations comparatives en eau distillée et eau lourde que nous avons précédemment décrit (10). Nous

(10) P. LÉPINE, J.-C. LEVADITI et J. GIUNTINI, C. R. Acad. Sci., 1942, 214, 568.



avons pris pour base des calculs la valeur de 1,3 adoptée par Elford et Galloway (tableau II).

On voit que pour une densité de 1,3 nos expériences attribuent au virus aphteux un diamètre de 14  $m\mu$ . Si l'on donnait à la densité de ce virus une valeur avoisinant celle que Pickels et Smadel attribuent au virus vaccinal, ou 1,17, le même calcul montrerait que le diamètre du virus aphteux serait de 19  $m\mu$ .

La constante de sédimentation s'obtient en appliquant la formule :

$$S = \frac{2r^2(\sigma_p - \sigma_m)}{9\eta},$$

ce qui donne pour une valeur de  $\eta_{20^\circ} = 0,01$ , et pour  $2R = d$  exprimé en  $m\mu$  :

$$S_{20} = \frac{d^2(\sigma_p - \sigma_m)}{180,35} 10^{-11} = 33,40 - 13.$$

*En résumé*, nos essais conduisent à attribuer au virus aphteux un *diamètre particulaire moyen d'environ 14 à 19  $m\mu$*  (la première de ces valeurs paraissant la plus probable) et une *constante de sédimentation* de :  $S_{20} = 33,40 - 13$ .

Ces résultats, obtenus par une méthode très simple, sont en accord satisfaisant avec les valeurs tirées d'autres méthodes et avec les valeurs de la constante de sédimentation observées par Janssen sur le virus obtenu à l'état pur.

Il ressort de l'ensemble des résultats obtenus par tous les auteurs que la valeur attribuée à la taille du virus aphteux présente un ordre de grandeur différent suivant les méthodes employées. L'ultrafiltration donne les valeurs les plus faibles. L'ultracentrifugation conduit à des chiffres sensiblement doubles, et l'irradiation indique un diamètre du triple de l'ultrafiltration.

Malgré cette apparente discordance, nous pensons que chacune des méthodes envisagées garde toute sa valeur relative. Les chiffres absolus ne pourront être déterminés que par de nouvelles expériences. Les divergences actuellement constatées entre les différentes méthodes en présence nous paraissent devoir être attribuées moins à une imperfection technique qu'à des raisons diverses (densité, forme du virus, rapport entre la section efficace et le diamètre réel, action de l'irradiation sur le milieu ambiant, ou du frottement sur les particules, etc.), dont l'explication, qu'il reste à trouver, demeure un des points les plus intéressants des recherches sur la taille des virus.

**UN MODE PARTICULIER D'AUTOLYSE MICROBIENNE :  
LA DÉSINTÉGRATION PROGRESSIVE  
DES BACILLES DU GENRE *MYCOBACTERIUM* (\*)**

par R. LAPORTE.

(Institut Pasteur,  
Laboratoire de Recherches sur la Tuberculose.)

L'attention des bactériologistes a souvent été retenue par la présence, dans les cultures de bacilles tuberculeux et dans celles des autres espèces du genre *Mycobacterium*, d'une substance ne possédant pas la résistance caractéristique des bacilles de ce genre à l'action décolorante des acides dilués. Les premiers chercheurs considérèrent cette « substance cyanophile » [Bezançon et Philibert] (1) comme le résultat d'une dégénérescence bactérienne (« détritits » de Strauss), mais, dans la suite, elle fut prise pour une sorte de « symplasma » dont Bezançon et Philibert (2), Fontes (3), Vaudremer (4), Morton Kahn et Nonidez (5) firent une étude morphologique détaillée sur des frottis ou sur des coupes de colonies. Ces auteurs estimèrent que les arguments d'ordre exclusivement morphologique qu'ils apportaient, suffisaient pour établir l'existence d'un cycle vital du bacille tuberculeux, dont la substance cyanophile constituerait un stade fondamental. C'est, en effet, dans son sein, que se différencieraient les nouveaux bacilles acido-résistants quand on transplante un fragment de culture sur un milieu neuf.

Cette hypothèse qui a suscité de vives critiques n'est pas fondée.

(\*) Communication présentée à la séance du 1<sup>er</sup> avril 1943 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

(1) La substance cyanophile est ainsi dénommée en raison de la couleur bleue qu'elle présente sur les frottis colorés par la technique de Ziehl-Neelsen, contrastant par là avec les bacilles acido-résistants qui sont colorés en rouge vif.

(2) BEZANÇON et PHILIBERT, *Bull. Soc. Etudes Tuberc.*, 2<sup>e</sup> série, 1914, 4, 32 ; *La Presse Médicale*, 9 janvier 1926, 33.

(3) FONTES, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1922, 15, 181.

(4) VAUDREMER, *Le bacille tuberculeux*, Les Presses Universitaires de France, Paris, 1927.

(5) M. KAHN et NONIDEZ, *Amer. Rev. Tuberc.*, 1936, 34, 360.



L'accroissement continu de la substance cyanophile dans les très vieilles cultures et l'homogénéisation progressive de la structure de cette substance, fait déjà observé par Bezançon et Philibert et plus récemment par Janik (6), semblent plutôt en faveur d'une dégénérescence ou lyse progressive des cultures qui atteindrait, en définitive, la substance cyanophile elle-même. On est ainsi ramené à l'opinion des premiers bactériologistes. Une preuve définitive que la substance cyanophile ne relève pas d'un cycle évolutif des bacilles, c'est que sa formation n'est pas interrompue quand on tue les cultures par des vapeurs de toluène, d'éther, de chloroforme ou de thymol. Par contre, la stérilisation à une température élevée qui détruit les endoferments cellulaires ou l'action antiseptique des poisons coagulants tels que le formol, arrêtent définitivement la formation de la substance cyanophile dans les cultures.

Les caractères particuliers de l'autolyse, ainsi démontrée, doivent retenir notre attention :

1° Il s'agit d'un processus dont l'évolution, lente et progressive, se poursuit pendant des mois. Le fait peut être aisément observé en examinant des frottis ou des coupes de colonies d'âge différent.

A l'examen microscopique sur frottis, les cultures jeunes montrent des amas de bacilles paraissant agglomérés par une substance amorphe, très peu apparente, et de structure homogène ou finement granuleuse. A un stade plus avancé, la fraction cyanophile s'accroît ; elle forme des amas ou des plages dont l'aspect est tantôt poussiéreux, avec un semis de granules plus foncés ; tantôt sous forme de réseau ou de filaments, ou encore de traînées et de placards mucoides. La structure granulaire domine largement. Il existe de nombreux granules ou corpuscules isolés. Les bacilles acido-résistants qui présentent parfois des formes d'involution se raréfient au fur et à mesure des progrès de la lyse mais ne disparaissent jamais complètement ; ils sont assez nombreux dans les stades jeunes pour dissimuler les parties bleues de la préparation ; mais avec de nombreuses souches humaines c'est le contraire qui est observé à partir du troisième ou quatrième mois après l'ensemencement.

Sur les coupes histologiques d'une culture autolysée, on trouve des zones entièrement dépourvues d'acido-résistance ; elles se disposent le plus souvent en couches continues et d'épaisseur inégale, à la surface extérieure des colonies ou des voiles. On doit observer d'ailleurs que la fraction non acido-résistante paraît toujours beaucoup plus importante sur les coupes provenant d'inclusions à la paraffine que sur les frottis des mêmes cultures. Ce fait, qui a frappé tous les observateurs, est dû à l'action préalable des sol-

(6) JANIK, *Zentralbl. Bakt.*, 1934, **131**, 462.



vants des lipoides utilisés pour l'inclusion. C'est donc sur les frottis directs que la substance cyanophile doit être étudiée quand on veut analyser ses caractères avec le plus de précision.

Habituellement, la substance cyanophile se présente sous forme d'une matière bleu pâle (coloration par le Ziehl-Neelsen) paraissant amorphe, et dans laquelle se trouvent une multitude de granules intensément colorés en bleu foncé. Ces corpuscules forment souvent de courts chapelets ayant la longueur d'un bacille. Sur les frottis ou sur les coupes de très vieilles cultures, la substance bleue

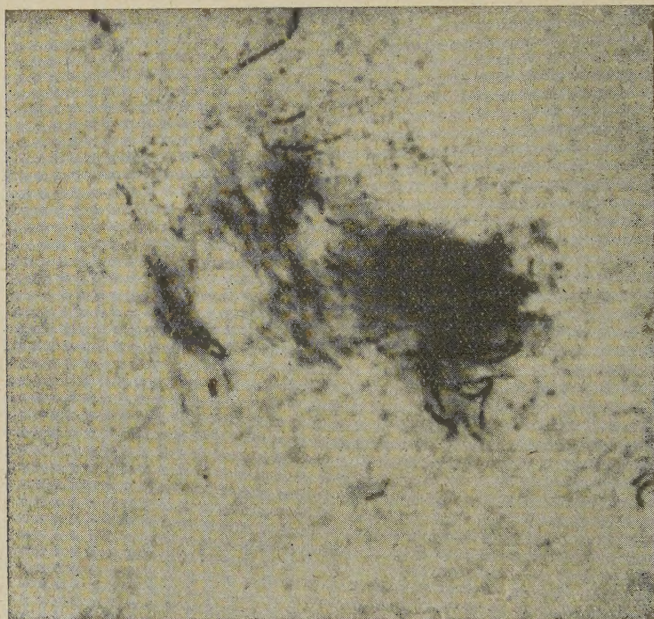


FIG. 1. — Frottis d'une culture âgée de quatre mois de la souche humaine M6, sur pomme de terre : bacilles acido-résistants en amas noyés dans une gangue de matière cyanophile; des granules libres, colorés en bleu, parsèment le fond de la préparation. Coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen. Gross. : 2.000 X. (Photo. Jeaniet.)

s'homogénéise et perd de plus en plus son affinité tinctoriale. La matière bleu pâle, « substance de liaison » de certains auteurs, provient, sans doute, de la fusion des « ectoplasmes bacillaires » selon l'opinion de Legroux et Magrou (7). Les grains libres colorés en bleu plus foncé dérivent vraisemblablement des granules endo-

(7) LEGROUX et MAGROU, ces *Annales*, 1920, 34, 417.



plasmiques des mêmes auteurs. Dans le corps bacillaire non désintégré ils doivent être figurés par ce qu'on a décrit sous le nom de corpuscules chromatiques.

En même temps que la fraction cyanophile s'accroît, l'autolyse qui lui donne naissance se traduit par une diminution progressive du poids de la culture. On peut effectuer la courbe, en fonction du temps, du poids des récoltes bacillaires filtrées, lavées et desséchées que l'on obtient, à 37°, avec une souche déterminée, dans

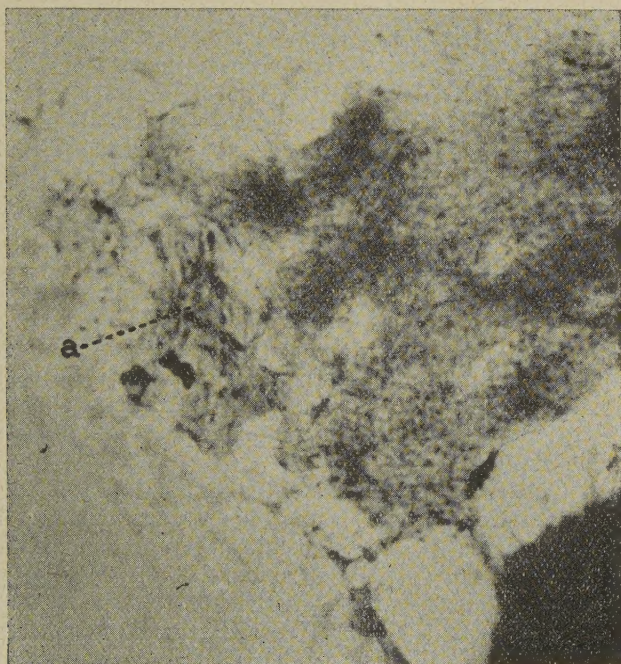


FIG. 2. — Frottis de la même culture à un stade plus avancé de l'autolyse. Des bacilles à peu près intacts forment un petit amas dans la partie gauche de la figure (a). Partout ailleurs la structure bacillaire a disparu avec l'acidorésistance; noter la constitution granulaire très nette de la substance cyanophile. Coloration par le Ziehl-Neelsen. Gross. : 2.000 X. (Photo. Jeantet.)

un volume fixe d'un milieu liquide. En opérant ainsi, Johnson et Renfrew (8) ont vu que les cultures de la souche humaine H 37, en milieu de Long, ont perdu, après seize semaines, 30 p. 100 du poids maximum atteint vers la septième semaine. Dans la suite

(8) JOHNSON et RENFREW, *Amer. Rev. Tuberc.*, 1928, 17, 508.



l'autolyse continue à progresser jusque vers la fin de la première année au moins ; à ce moment la diminution du poids des cultures peut atteindre 50 à 70 p. 100 avec la majorité des souches humaines et dépasser 90 p. 100 pour certaines souches de bacilles paratuberculeux.

2° L'intensité du processus lytique est, en effet, très variable suivant les souches et les conditions de culture qui leur sont offertes. C'est là un caractère général de l'autolyse microbienne. Les souches humaines de bacille tuberculeux sont, dans la règle, les plus sujettes à la lyse ; les aviaires et les bovines le sont beaucoup moins, surtout dans leur variante lisse. En étudiant le mécanisme de la lyse nous reviendrons ultérieurement sur l'influence que les conditions de culture exercent sur ce phénomène.

3° La désintégration autolytique des éléments bacillaires a pour effet de libérer leurs constituants sous une forme soluble ou non dans le milieu ambiant. Parmi les produits solubles se placent des protéides à molécules de taille variable et des polysaccharides. La fraction insoluble est constituée en majeure partie par les corpuscules non acido-résistants. On peut isoler cette substance granulaire en soumettant une suspension en eau distillée d'une culture autolysée à l'action d'une centrifugation prolongée à grande vitesse (9). Cette opération a pour effet de séparer les bacilles intacts, qui forment le culot, des corpuscules libres qui restent en suspension dans l'eau. On obtient ainsi des suspensions de la substance granulaire cyanophile, d'un aspect laiteux et d'une remarquable stabilité.

4° On doit observer que les constituants bacillaires sont libérés par la désintégration des corps microbiens dans un état physico-chimique qui semble voisin de celui qu'ils possèdent dans les bacilles intacts. Parmi ces constituants, les protéides à grosses molécules, précipitables par l'acide trichloracétique à 8 p. 100, sont tout spécialement à retenir. On sait (Long et Seibert) qu'en ce qui concerne le bacille tuberculeux, c'est en eux que réside l'activité tuberculinique maxima. Sans doute, ces protéides subissent partiellement eux-mêmes, pendant ou après leur libération, un clivage progressif qui libère des substances azotées plus simples, telles les protéoses spécialement étudiées par Boquet et Sandor ; mais il n'en est pas moins vrai que ces protéides semblent, en majeure partie, peu altérés et assez semblables à ceux que l'on peut retirer, par d'autres techniques, des corps bacillaires non lysés. La fraction des protéides à grosses molécules libérés par l'autolyse peut atteindre 15 p. 100 et plus du poids des cultures lorsqu'il s'agit du bacille tuberculeux et jusqu'à 40 p. 100 avec certaines souches de bacilles acido-résistants saprophytes. On sait

(9) R. LAPORTE, *C. R. Acad. Sci.*, 1941, **242**, 138.



que ces substances possèdent une très haute activité réactionnelle pour les sujets infectés par le bacille de Koch.

5° On est ainsi conduit à mesurer l'importance biologique de l'autolyse bacillaire **en ce qui concerne spécialement** le bacille de la tuberculose. Les produits résultant de la désintégration des germes sont **tous plus ou moins actifs** : les uns, tout spécialement les protéides, déclenchent et entretiennent les réactions allergiques ; les autres, telle la fraction insoluble, de structure granulaire que nous **avons pu isoler et étudier dans ses propriétés** biologiques, possèdent une activité tuberculigène, antigénique et sensibilisante considérable ; ils interviennent aussi au cours des réactions tuberculiniques. Si, comme on est en droit de le penser, la désintégration progressive des bacilles s'opère, dans les tissus de l'hôte, d'une manière semblable à celle qu'elle revêt *in vitro*, son importance ne saurait échapper. Une action irritante, entretenue par la libération progressive de produits actifs et diffusibles, est sans doute une explication, au moins partielle, de la manière lente et graduelle dont s'opèrent les réactions tissulaires dans l'infection tuberculeuse.



**ÉTUDE QUANTITATIVE  
DE LA PRÉCIPITATION DE SÉRUMS  
ANTICHARBONNEUX ET NORMAUX  
PAR DIFFÉRENTES SOLUTIONS DE GÉLOSE (\*)**

par ANNE-MARIE STAUB et P. GRABAR.

Plusieurs auteurs, voulant étudier la précipitation d'immunsérums par les extraits microbiens homologues ou l'agglutination de bactéries cultivées sur gélose, ont remarqué que les sérums précipitent avec la gélose contenue dans l'extrait ou la suspension.

Le D<sup>r</sup> G. Girard (1) a noté le fait pour des sérums antipesteux, Sordelli et Mayer pour des sérums antityphiques et anticharbonneux, tous ces sérums étant préparés par injection à des chevaux d'émulsions microbiennes contenant de la gélose. Ces derniers auteurs ont étudié longuement cette précipitation (2). D'après leurs travaux, les anticorps antigélose sont des entités bien définies absolument distinctes des anticorps antimicrobiens : la saturation du sérum par la gélose ou un extrait microbien exempt de gélose permet en effet la mise en évidence de l'autre anticorps. Toutefois, la gélose injectée seule au cheval serait incapable de faire apparaître dans son sang les anticorps homologues : il est nécessaire pour cela qu'elle soit associée aux microbes en un complexe, aisément dissociable du reste, par simple lavage à l'eau physiologique.

Au cours d'une étude quantitative sur la précipitation des anticorps contenus dans l'immunsérum anticharbonneux par les antigènes homologues, nous nous sommes heurtés à la même difficulté : notre sérum précipite une solution de gélose, que celle-ci soit obtenue par rinçage d'une boîte de Roux non ensemencée ou par dissolution de la gélose dans l'eau physiologique. Il est impossible dans ces conditions d'étudier la précipitation d'un sérum anticharbonneux par un extrait de microbes cultivés sur gélose, avant d'en avoir éliminé les précipitines antigélose. Afin de savoir

(\*) Communication présentée à la séance du 6 mai 1943 de l'Association des Microbiologistes de Langue Française.

(1) Observation inédite. Voir la discussion qui suit cette communication.

(2) C. R. Soc. Biol., 1931, **107**, 736 ; *Folia biologica* (Buenos Aires), 1932, n° 11 à 27.

quelle solution de gélose était apte à saturer totalement les anticorps antigélose de notre sérum, nous avons entrepris l'étude quantitative de cette précipitation avec diverses solutions de gélose suivant la technique de Heidelberger (3) : dosage de l'azote des précipités après double lavage à froid par l'eau physiologique.

A. — PRÉCIPITATION DES ANTICORPS ANTIGÉLOSE  
D'UN SÉRUM ANTICARBONNEUX

PAR L'EAU DE LAVAGE D'UNE BOÎTE DE ROUX. « EXTRAIT A BLANC ».

La solution de gélose employée pour la précipitation est préparée de la manière suivante : on verse dans une boîte de Roux, contenant une plaque de gélose nutritive stérile, 30 c. c. d'eau distillée, on ajoute des billes, on agite, puis on laisse l'eau en contact avec la gélose pendant une demi-heure. La solution retirée de la boîte est alors salée à 8,5 p. 1.000, centrifugée, puis additionnée d'un antiseptique pour la conservation (merthiolate 1/10.000 ou formol 2,5/1.000). Les résultats obtenus avec différents « extraits à blanc » ainsi préparés sont consignés dans le tableau I. Ils

TABEAU I.

ANTISEPTIQUE	EXTRAIT	QUANTITÉ d'extrait nécessaire pour saturer 2 c. c. de sérum	N EN $\gamma$ (1/1.000 mg.) dosé dans le précipité spécifique obtenu à la saturation de 2 c. c. de sérum
Merthiolate. . . . .	ED <sub>2</sub>	2 c. c.	84
	ED <sub>4</sub>	1 c. c.	90
	ED <sub>5m</sub>	1 c. c.	83
Formol . . . . .	ED <sub>5f</sub>	2 c. c.	83

montrent : 1° que la quantité d'anticorps précipités à la saturation du sérum est sensiblement la même avec les différents « extraits » ;

2° Que cette saturation est toujours atteinte après addition d'un volume d'extrait égal à celui du sérum (2 c. c. pour 2 c. c.) ;

3° Que le formol ne semble pas gêner la saturation des anticorps du sérum : on obtient le même chiffre avec les deux extraits ED<sub>5</sub> additionnés de merthiolate ou de formol.

(3) M. HEIDELBERGER, *Chem. Rev.*, 1939, **24**, 323. Voir aussi : G. J. P. HORNUS et P. GRABAR, ces *Annales*, 1941, **66**, 136.



B. — PRÉCIPITATION DES ANTICORPS ANTIGÉLOSE  
DU MÊME SÉRUM ANTICHARBONNEUX  
PAR DIFFÉRENTES SOLUTIONS DE GÉLOSE.

Les solutions de gélose employées pour la précipitation sont, cette fois, préparées directement par dissolution de la gélose à chaud dans l'eau physiologique (solution 1/500) ; on autoclave s'il y a lieu, puis après refroidissement on filtre la solution qui a fait légèrement prise. On ajoute enfin l'antiseptique. Sur la figure 1, les courbes A, B, C représentent la précipitation des anticorps antigélose contenus dans 2 c. c. d'un même sérum, soit par un extrait ED<sub>2</sub> (voir plus haut) [A], soit par une solution de gélose autoclavée [B], soit par une solution de gélose non autoclavée [C].

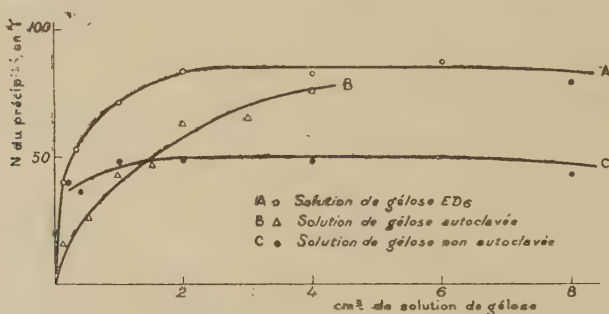


FIG. 1. — Précipitation du sérum anticharbonneux par diverses solutions de gélose.

On voit qu'il est impossible de précipiter la totalité des anticorps antigélose d'un sérum précipitant, avec une solution de gélose non autoclavée ; cela, par contre, est possible avec une solution autoclavée ; mais il faut, dans ce cas, un volume beaucoup plus grand de solution qu'avec l'extrait ED<sub>6</sub> puisque le maximum de la courbe B n'est pas encore tout à fait atteint avec 4 c. c. de solution de gélose. Notons toutefois qu'au cours d'un essai avec une autre solution de gélose, ayant subi l'autoclavage, nous avons atteint la saturation avec 2 c. c. de solution. Il semblerait donc qu'on puisse distinguer deux sortes de substances précipitantes dans les solutions de gélose. Les unes étant communes aux solutions non autoclavées et autoclavées, les autres n'apparaissant qu'après autoclavage, en quantités susceptibles de varier d'une préparation à l'autre.

Si maintenant on étudie l'action des antiseptiques ajoutés aux solutions pour leur conservation, les dosages montrent que : 1° le merthiolate et l'éther ne gênent pas la précipitation des anticorps antigélose par leurs antigènes ; 2° le formol ne modifie pas la précipitation du sérum par les solutions de gélose non auto-

clavées ; 3° le formol modifie considérablement la précipitation du sérum par les solutions de gélose autoclavées. Dans ce cas, non seulement il est impossible d'atteindre la saturation de tous les anticorps, mais on constate en outre que les anticorps précipitent de moins en moins lorsqu'on ajoute au sérum des volumes croissants d'une même solution de gélose. Pour expliquer ce fait, on peut invoquer la fixation du formol contenu dans la solution antigénique, sur les anticorps, les rendant ainsi inaptes à précipiter. Dans les extraits ED obtenus par lavage des boîtes de Roux, la petite quantité de bouillon dissoute avec la gélose fixerait le formol. Celui-ci n'étant plus libre ne pourrait plus inactiver les anticorps : d'où l'identité des résultats obtenus avec « ED<sub>s</sub> » formolé ou merthiolaté (tableau I).

C. — PRÉCIPITATION DE SÉRUMS NORMAUX  
PAR LES SOLUTIONS DE GÉLOSE.

Au cours de cette étude, nous avons remarqué que des sérums de chevaux normaux de provenances diverses précipitaient avec nos solutions de gélose. Recherchant si ce phénomène était général avec des sérums normaux d'espèces différentes, nous avons obtenu les résultats consignés dans le tableau II. On voit que tous les sérums de chevaux n'ayant pas reçu d'injection de gélose précipitent, de même pour le chien. Les résultats sont au contraire négatifs avec les deux sérums de lapin.

TABEAU II.

CHEVAL					CHIEN	LAPIN	
Normal	Anti-pneumococcique 1	Anti-pneumococcique 2	Antivibrion	Antityphique		Anticheval	Normal
++	++	++	±	+	++	0	0

Ce phénomène présente l'aspect d'une précipitation spécifique et cette ressemblance se maintient lorsqu'on passe à l'étude quantitative ; même allure des courbes (4) [fig. 2], même dissolution du

(4) La quantité d'azote contenue dans le précipité à saturation est supérieure à celle dosée avec un sérum anticharbonneux. Le sérum normal utilisé provient dans ce cas d'un cheval tué aux abattoirs, donc peu suspect d'avoir reçu des injections de gélose.



précipité dans un excès de gélose (30 c. c.) [point non figuré sur la courbe (5)]. Dans ce cas, comme dans celui du sérum anti-charbonneux, la précipitation n'est pas la même lorsqu'on l'effectue avec une solution de gélose autoclavée (ED<sub>6</sub>, fig. 2 A) ou non (fig. 2 C). On retrouve aussi l'action du formol. Toutefois dans ce cas, contrairement à ce qui se passe avec le sérum anti-charbonneux, si la quantité d'anticorps précipités est moindre qu'avec une solution non formolée, elle se maintient constante à son maximum (fig. 2 B).

Nous rapprocherons ces résultats de ceux observés par Uhlenhuth (6) : des sérums normaux de cheval, d'âne, de bœuf, de porc ou de mouton sont précipités par de la gomme arabique alors que cette précipitation fait défaut avec les sérums normaux de

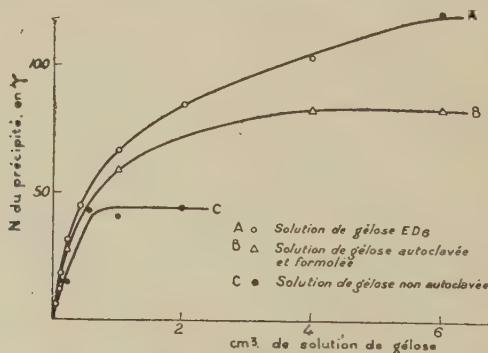


FIG. 2. — Précipitation du sérum normal par diverses solutions de gélose.

l'homme, du lapin et du cobaye. A la suite d'injections de gomme arabique à des lapins dont le sérum est inactif, Uhlenhuth a pu obtenir des sérums précipitant cette substance. Si dans ce dernier cas et dans celui des immunosérums, cités au début de cette note, on peut encore penser à une précipitation spécifique des anticorps homologues du sérum par la gomme arabique ou la gélose, cette interprétation devient difficile avec les sérums normaux. Il faudrait invoquer une immunisation des chevaux, soit au cours d'une maladie, soit par voie digestive, par un antigène commun à la gélose ou à la gomme arabique et aux microbes ou aux fourrages. On est plus tenté de rapprocher ce phénomène de la précipitation des protéides sanguins par certaines substances, tel le colorant « bleu d'isamine » signalé par Marrack (7). On peut se demander

(5) Mais il peut s'agir, dans ce cas, d'une simple dissolution du précipité dans le grand volume d'eau physiologique qui dissout la gélose.

(6) Cité par P. UHLENHUTH et E. REMY, *Zeit. Immunitätsf.*, 1933, 79, 318.

(7) J. MARRACK, III<sup>e</sup> Congrès intern. de Microbiologie, New-York, 1939, 821.

alors jusqu'à quel point l'élimination des substances précipitantes de nos immunsérums, par les solutions de gélose, ne modifie pas leur teneur en anticorps antimicrobiens. Pour répondre à cette question, nous avons précipité par le haptène somatique charbonneux, un sérum anticharbonneux débarrassé des substances précipitant par la gélose ; nous avons pu constater qu'il y avait alors une quantité d'anticorps précipités beaucoup plus faible que dans le cas du même sérum non précipité par la gélose (tableau III).

TABLEAU III.

	VOLUME DE SÉRUM	HAPTÈNE	N EN γ du précipité
Sérum anticharbonneux 811 . . .	2 c.c.	0,2 mg.	105
Sérum 811 précipité par la gélose.	4 c.c. contenant 2 c.c. de sérum.	0,2 mg.	83

On voit combien la question est complexe. Aussi nous bornons-nous dans cet exposé à la signaler à l'intérêt des biochimistes, tout en mettant en garde les immunologistes contre les erreurs que ces phénomènes pourraient leur faire commettre.

## CONCLUSIONS.

Pour éliminer d'un immunsérum les substances précipitées par la gélose (anticorps ?), il est indispensable d'utiliser une solution de gélose autoclavée, ne contenant pas de formol, ou mieux, l'eau de lavage d'une boîte de Roux contenant de la gélose nutritive stérile ; le formol peut être utilisé cette fois pour la conservation. L'élimination des substances précipitant la gélose entraîne une partie des anticorps spécifiques antipolysaccharidiques d'un sérum anticharbonneux.

Certains sérums normaux de cheval et de chien précipitent abondamment avec les solutions de gélose.

**M. G. Girard :** La présence de précipitines à l'égard de la gélose dans un sérum, tel le sérum antipesteux qui est préparé chez le cheval avec des bacilles cultivés sur gélose et injectés par voie veineuse, est de nature à créer des erreurs d'interprétation dans les réactions non seulement de précipitation, mais encore d'agglutination, quand on emploie pour celles-ci des émulsions microbiennes provenant de cultures sur milieux gélosés. Nous avons été très intrigués de voir un sérum antipesteux précipiter avec les extraits microbiens les plus divers et agglutiner jusqu'à 1 p. 200 des germes n'ayant aucune communauté antigénique avec le bacille de la peste, comme plusieurs *salmonella* et



la typhose aviaire. Quand nous avons eu connaissance de la note de Sordelli, nous avons, sur le conseil de M. Machebœuf, recherché et constaté l'existence de ces précipités antigélose dont l'élimination, par un procédé analogue à celui de la saturation des agglutinines, nous a permis de retrouver la spécificité de notre sérum antipesteux au point de vue de son pouvoir précipitant et agglutinant.

# ACTION DES AGENTS CANCÉRIGÈNES CHIMIQUES SUR LES LEVURES

## ACTION DE L'ARSENIC (\*)

par P. BERAUD.

### APPARITION DE CARACTÈRES NOUVEAUX CHEZ LES LEVURES SOUS L'INFLUENCE DE L'ARSÉNIATE DE SODIUM.

**MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES.** — On observe lorsqu'on cultive, pour la première fois, une levure en présence d'arséniate, des modifications dans la forme et dans la taille des globules. Si la levure traitée est une levure du type *ellipsoïdeus*, la forme ellipsoïdale tend à disparaître pour faire face à la forme sphérique (fig. 2). La nouvelle forme sphérique se maintient, ensuite, indéfiniment dans la suite des passages en milieu à l'arséniate.

Avec la levure Springer, il est fréquent de voir apparaître des cellules de grande taille dont le diamètre dépasse quelquefois le double du diamètre moyen des cellules normales. Ces cellules peuvent se reproduire en donnant naissance à des cellules de même taille mais leur descendance est en général limitée.

Le phénomène inverse peut avoir lieu. C'est ainsi que des colonies de *Schizosaccharomyces pombe* se développant lors d'un premier passage de cette levure dans de l'eau de touraillons arséniatee, gélatinée, sont quelquefois constituées par des cellules dont la longueur est inférieure d'un tiers ou même de moitié à la longueur normale. Ce caractère se maintient parfois pendant plusieurs dizaines de repiquages en milieu à l'arséniate.

**POIDS MOYEN SEC DES CELLULES.** — Le poids des cellules subit, du fait, en partie, du changement de leur volume, d'importantes variations dont voici quelques exemples :

De la levure Springer, provenant de cultures réalisées dans différentes conditions, est purifiée par deux centrifugations et lavages successifs. Une partie aliquote de la suspension finale est centrifugée de nouveau et le culot de centrifugation est desséché à 105° jusqu'à poids constant. La numération des globules est effectuée sur une autre partie aliquote de la suspension. Il est possible de cette manière de connaître le poids moyen sec des cellules. Les

(\*) Voir ces *Annales*, 1943, 69, 230.



variations de poids sont indiquées dans le tableau I et représentées graphiquement dans la figure 3. Ces variations ne doivent pas être rattachées uniquement au changement de volume des cellules,

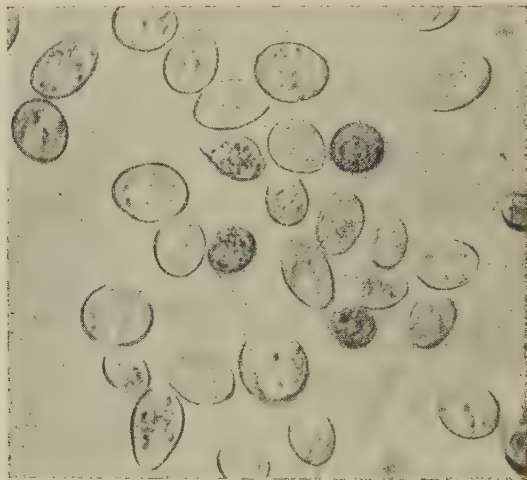


FIG. 2 A. — Levure Springer (culture de quatre jours).

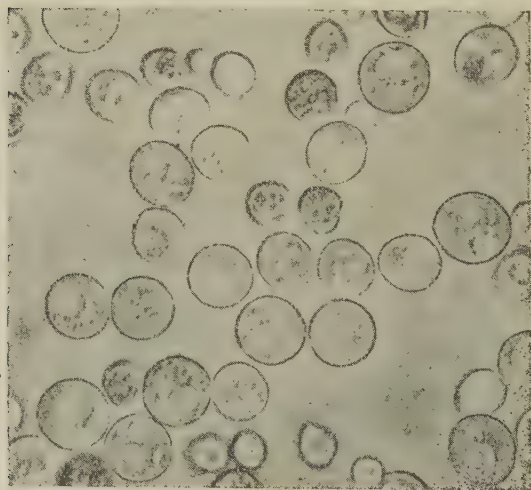


FIG. 2 B. — Levure Springer au 4<sup>e</sup> passage en eau de touraillons contenant  $\frac{M}{200}$  d'arséniate (culture de quatre jours). [Institut Pasteur. Microphotographie : P. Jeantet.]

elles sont imputables, en partie, aux variations de densité du contenu cellulaire. Le chiffre obtenu en divisant le poids sec d'un culot de levure par le volume qu'occupait ce culot avant dessiccation (centrifugation à 3.400 tours-minute pendant cinq minutes) varie, en effet, entre 0,24 et 0,33.

Il n'est pas possible d'établir de règle fixe quant aux variations de poids des cellules. C'est ainsi que pour la levure Springer le poids moyen sec des cellules croissant en milieu arseniqué est tantôt supérieur, tantôt inférieur au poids moyen sec de la levure témoin. Souvent les écarts se maintiennent du même sens pendant

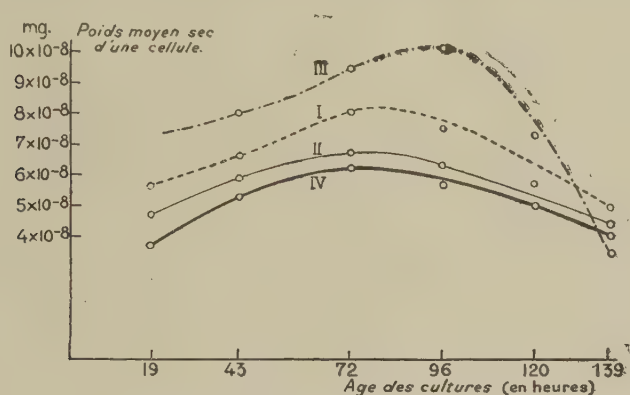


FIG. 3. — I, Levure Springer témoin; III, Levure Springer au 10<sup>e</sup> passage en eau de touraillons à  $\frac{M}{200}$  d'arséniate; IV, Levure Springer accoutumée, au 3<sup>e</sup> passage en eau de touraillons sans arséniate; II, Levure Springer accoutumée, au 26<sup>e</sup> passage en eau de touraillons sans arséniate.

plusieurs passages, puis ils s'annulent ou s'inversent. Il semble, cependant, que le poids moyen sec de la levure accoutumée, puis repiquée dans un milieu sans arséniate, soit toujours inférieur au poids moyen sec de la levure témoin.

Ces observations entraînent une conclusion pratique immédiate. C'est qu'il n'est pas possible de se baser sur les poids secs pour étudier comparativement la multiplication des levures en présence et en l'absence d'arsenic. La densité optique d'un nombre déterminé de globules variant en général comme leur poids sec [20], il n'est pas possible, d'autre part, de faire appel ici à l'électrophotomètre. Ces remarques dépassent, d'ailleurs, le cadre de la présente étude. Elles s'appliquent dans le cas d'autres antiseptiques, en particulier, dans le cas des fluorures.

Une constatation que l'on peut faire d'une façon constante est la chute rapide du poids moyen sec des levures cultivées en présence d'arsenic. L'aspect des cellules et le fait que le phénomène



TABLEAU I. — Variations du poids moyen sec des cellules.

	AGE DES CULTURES (EN HEURES)				
	19	43	72	96	120
Levure Springer témoin . . . . .	$5,7 \times 10^{-8}$ mg.	$6,6 \times 10^{-8}$ mg.	$8,4 \times 10^{-8}$ mg.	$7,6 \times 10^{-8}$ mg.	$5 \times 10^{-8}$ mg.
Levure Springer au 40 <sup>e</sup> passage dans de l'eau de touraillons contenant M d'arséniate . . . . .		$8 \times 10^{-8}$ mg.	$9,5 \times 10^{-8}$ mg.	$10,2 \times 10^{-8}$ mg.	$7,4 \times 10^{-8}$ mg.
3 <sup>e</sup> passage, en eau de touraillons sans arsenic, de la levure Springer acoutumée à M d'arséniate . . . . .	$3,7 \times 10^{-8}$ mg.	$5,3 \times 10^{-8}$ mg.	$6,3 \times 10^{-8}$ mg.	$5,8 \times 10^{-8}$ mg.	$5,4 \times 10^{-8}$ mg.
26 <sup>e</sup> passage, en eau de touraillons sans arsenic, de la levure Springer acoutumée à M d'arséniate . . . . .	$4,7 \times 10^{-8}$ mg.	$5,9 \times 10^{-8}$ mg.	$6,7 \times 10^{-8}$ mg.	$6,4 \times 10^{-8}$ mg.	$5,7 \times 10^{-8}$ mg.

TABLEAU II. — Variations du poids moyen sec des globules de la levure Verzenay.

	AGE DES CULTURES (EN JOURS)				
	2	3	6	12	56
Levure Verzenay (témoin). . . . .	$2,9 \times 10^{-8}$ mg.	$2,7 \times 10^{-8}$ mg.	$3,8 \times 10^{-8}$ mg.	$3,4 \times 10^{-8}$ mg.	$2,9 \times 10^{-8}$ mg.
6 <sup>e</sup> passage, en eau de touraillons sans arsenic, de la levure Verzenay accoutumée à M d'arséniate . . . . .	$2 \times 10^{-8}$ mg.	$2,4 \times 10^{-8}$ mg.	$3,6 \times 10^{-8}$ mg.	$2,2 \times 10^{-8}$ mg.	$4,4 \times 10^{-8}$ mg.

est plus sensible à 30-35° qu'à 25°, indique que l'on se trouve en présence d'un processus d'autolyse accélérée. L'apparition rapide de phénomènes d'autolyse dans les cultures de microorganismes effectuées en présence d'un antiseptique est un fait connu des bactériologistes [21, 22]. Dans le cas de l'arsenic, il arrive que la levure garde cette propriété de s'autolyser rapidement même après de nombreux repiquages en milieu sans arsenic. Voici, par exemple, les variations du poids moyen sec des cellules de la levure de champagne Verzenay accoutumée à une dose de  $\frac{M}{50}$  d'arséniate (tableau II).

Ces résultats sont d'autant plus significatifs que l'expérience avait lieu à 23°, température à laquelle l'autolyse de la levure Verzenay est habituellement très lente.

**MODIFICATIONS DE LA VITESSE DE MULTIPLICATION.** — Le développement de la levure, fortement inhibé au début par la présence d'arséniate, reprend peu à peu son allure normale, au fur et à mesure des progrès de l'accoutumance. Ce phénomène que révèle la simple observation microscopique, comme on l'a vu précédemment, a été étudié aussi statistiquement. Les courbes de la figure 4 en fournissent une représentation graphique. D'autres expériences ont porté sur de la levure Springer accoutumée à pousser en eau de touraillons saccharosée, contenant  $\frac{M}{200}$  d'arséniate, par 18 passages successifs. Après accoutumance, la levure, ensemencée à nouveau en eau de touraillons sans arsenic, se développe, à partir du deuxième ou troisième passage, avec une vitesse notablement plus grande que la levure témoin, toutes choses étant égales d'ailleurs. Les déterminations suivantes ont été réalisées au quatrième et au quinzième passage sur milieu sans antiseptique. Les cultures étaient effectuées dans des flacons de 500 c. c. contenant chacun 300 c. c. d'eau de touraillons saccharosée à 10 p. 100. Les suspensions de levure destinées aux ensemencements étaient d'abord numérees au compte-globules. En se basant sur cette numération on introduisait dans les flacons un volume de suspension tel que le liquide du flacon contenait approximativement, après ensemencement, 100.000 globules par centimètre cube. Pendant toute la durée de l'expérience, chaque flacon recevait de l'air stérile par le moyen d'un tube effilé plongeant dans la masse du liquide. Les cultures ont été maintenues à l'étuve à 27° et numérees à des intervalles de temps variables. Chacun des points de la figure 4 correspond à la moyenne des comptes effectués, chaque fois, avec 3 flacons différents.

Une deuxième série d'essais a été conduite d'une façon analogue mais sans aération. Enfin les courbes II et III des figures 4 et 5



représentent le développement de la levure Springer en présence d'arséniate. Elles montrent que l'aération favorise l'accoutumance.

On voit que l'accélération de la vitesse de multiplication est moins importante au quinzième qu'au quatrième passage sur milieu sans antiseptique. Elle tend donc à s'atténuer au fur et à mesure des passages successifs. Cette constatation amène à penser que l'accélération du phénomène de la multiplication pour-

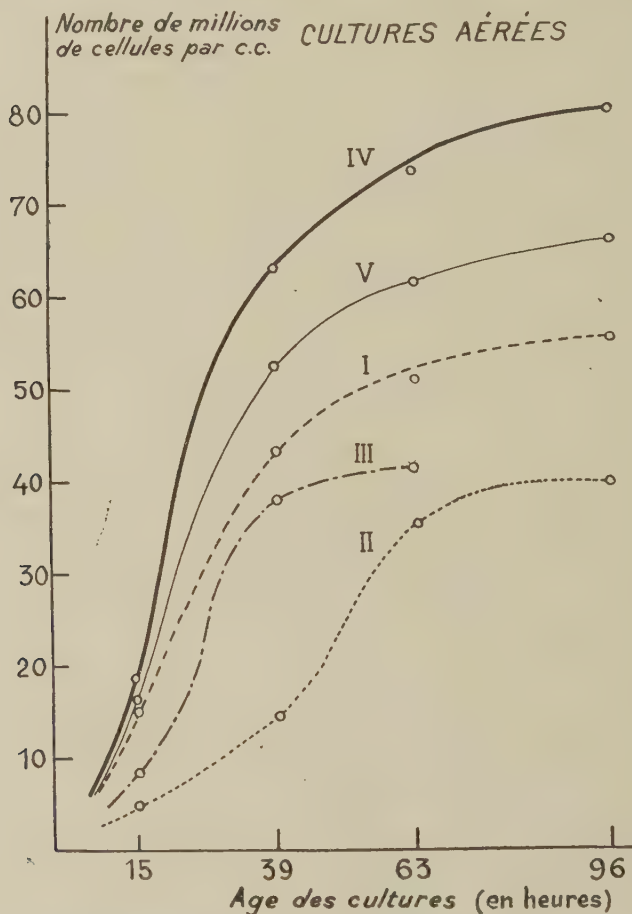


FIG. 4. — I, Levure Springer témoin; II, Levure Springer au 1<sup>er</sup> passage en eau de touraillons contenant  $\frac{M}{200}$  d'arséniate; III, Levure Springer au 13<sup>e</sup> passage en eau de touraillons contenant  $\frac{M}{200}$  d'arséniate; IV, Levure Springer accoutumée, au 4<sup>e</sup> passage sans arséniate; V, Levure Springer accoutumée, au 15<sup>e</sup> passage sans arséniate.

rait être due à de petites quantités d'arséniate introduites avec la semence, lors des premiers repiquages en milieu sans antiseptique. Cependant le même phénomène se produit lorsque l'on ensemence les milieux au fil de platine. Il ne saurait être question, dans ce dernier cas, de l'action excitatrice de petites doses d'arséniate, la quantité de cette substance introduite dans le milieu de culture étant infinitésimale dès le deuxième repiquage. D'autre part des essais directs, réalisés en cultivant la levure Springer en présence

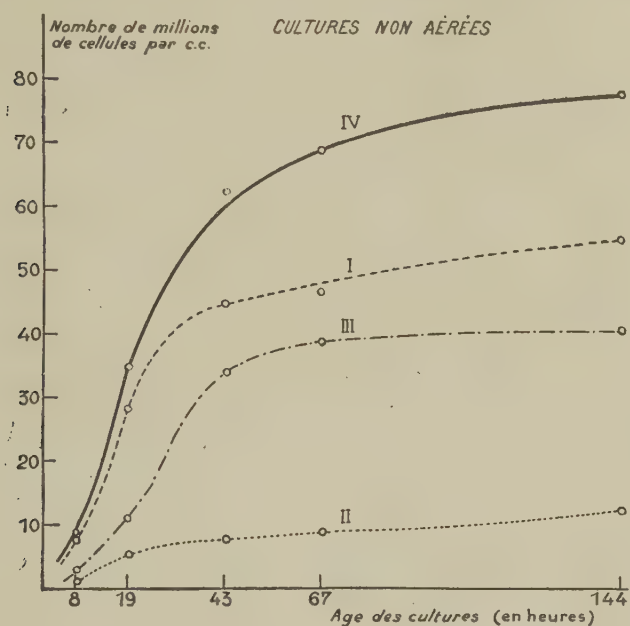


FIG. 5. — I, Levure Springer témoin; II, Levure Springer témoin au 1<sup>er</sup> passage en eau de touraillons contenant  $\frac{M}{200}$  d'arséniate; III, Levure Springer au 18<sup>e</sup> passage en eau de touraillons contenant  $\frac{M}{200}$  d'arséniate; IV, Levure Springer accoutumée, au 4<sup>e</sup> passage sans arséniate.

de doses croissantes d'arséniate, montrent qu'il n'y a pas, aux petites doses, d'accélération sensible du développement.

L'accélération de la multiplication à la suite du traitement à l'arsenic ne se produit pas avec toutes les levures. Nous n'avons pu déceler aucun phénomène de ce genre chez des levures de champagne.

MODIFICATIONS DU POUVOIR FERMENTATIF ET DU POUVOIR RESPIRATOIRE. — Si l'on étudie à l'aide de l'appareil manométrique de



Warburg (1) l'action de l'arséniate de sodium sur les échanges gazeux de la levure Springer séparée de son liquide de culture par centrifugation et mise en suspension dans une solution de phosphate glucosée, on ne constate aucun effet sensible à la dose  $\frac{M}{200}$  habituellement utilisée au cours de ce travail. Aux concentrations plus élevées la fermentation et la respiration sont inhibées de façon croissante. Mais l'arséniate exerce sur la levure une action indirecte qui paraît beaucoup plus importante que son action immédiate. Si l'on mesure, en effet, le pouvoir fermentatif et le pouvoir respiratoire d'une levure qui vient de subir un premier passage en eau de touraillons contenant  $\frac{M}{200}$  d'arséniate,

on obtient pour ces différentes grandeurs des valeurs supérieures à celles que l'on obtient avec la levure témoin (2). Les décalages constatés s'atténuent très vite avec le nombre des passages de la levure en milieu à l'arséniate (tableau III).

Dans l'étude des échanges gazeux des levures accoutumées à l'arséniate nous avons cherché à retrouver les résultats obtenus par Y. Pourbaix [2] à propos de l'action d'un agent cancérogène chimique, le styryl 430. En présence de cette substance, la phase phosphorylante de la fermentation du glucose par la levure est supprimée et remplacée par une phase non phosphorylante. Ce changement peut être mis en évidence en introduisant dans le milieu en fermentation du fluorure de sodium à la concentration 0,02 M, qui inhibe seulement la phase phosphorylante. Nous n'avons pu déceler un phénomène semblable chez les levures accoutumées à l'arséniate : l'inhibition par le fluorure est proportionnellement aussi importante pour ces levures que pour les levures témoins.

Les conclusions relatives aux mesures des pouvoirs fermentatifs et respiratoires des levures traitées à l'arsenic seront tirées plus loin. Dès à présent, cependant, nous pouvons nous demander quelle est la valeur exacte de ces mesures. Pour des raisons de commodité, les dégagements de gaz carbonique ou les absorptions d'oxygène sont ramenés habituellement au poids sec des microorga-

(1) Pour la description de la méthode manométrique de Warburg, consulter le livre *Stoffwechsel der Tumoren* [1].

(2) Lorsque la levure Springer est cultivée pour la première fois en présence d'arséniate  $\frac{M}{200}$  de nombreuses cellules de la semence sont tuées. Les chiffres trouvés dans ce cas pour les échanges gazeux constituent donc théoriquement des minima. En fait, la récolte étant près de cent fois supérieure à la semence, les erreurs pouvant résulter de cette circonstance sont négligeables.

TABLEAU III.

	AGE de la culture	$Q_{O_2}$ (1)	$Q_{CO_2}^{O_2}$ (2)	$Q_{CO_2}^{N_2}$ (3)
Levure Springer témoin . . . . .	1 jour.	15	248	256
	2 jours.	17	149	161
	3 jours.	17	104	111
	4 jours.	19	90	98
Levure Springer au 1 <sup>er</sup> passage en eau de touraillons contenant $\frac{M}{200}$ d'arséniate. . . . .	1 jour.	—	—	—
	2 jours.	22	187	199
	3 jours.	24	166	165
	4 jours.	22	106	113
Levure Springer au 2 <sup>e</sup> passage en eau de touraillons contenant $\frac{M}{200}$ d'arséniate. . . . .	1 jour.	15	225	236
	2 jours.	16	144	168
	3 jours.	16	98	96
	4 jours.	15	93	98

(1)  $Q_{O_2}$  Nombre de millimètres cubes d'oxygène absorbés en une heure par la quantité de levure dont le poids sec est 1 mg.

(2)  $Q_{CO_2}^{O_2}$  Nombre de millimètres cubes de  $CO_2$  dégagés, en une heure, par fermentation aérobie, par la même quantité de levure.

(3)  $Q_{CO_2}^{N_2}$  Nombre de millimètres cubes de  $CO_2$  dégagés, en une heure, en atmosphère d'azote, par la même quantité de levure.

La levure destinée aux mesures est mise en suspension dans une solution à 5 p. 1.000 de  $PO_4H_2K$  contenant 1 p. 100 de glucose. Le thermostat est réglé à la température de 25°.

nismes mis en œuvre. Cette façon de faire est arbitraire. Rien ne prouve, en effet, que les échanges gazeux correspondant à un poids déterminé de levure ne soient pas fonction de la surface extérieure présentée par les globules. Pour être vraiment significative la mesure des échanges gazeux devrait être ramenée, non seulement au poids de la levure mise en œuvre, mais encore à la surface extérieure totale présentée par les cellules de levure. Cette dernière opération est difficile à réaliser avec la levure Springer dont les cellules sont des ellipsoïdes plus ou moins allongées. Par contre, elle peut être tentée pour des cultures de cette levure effectuées en présence d'arsenic. C'est ainsi qu'au premier passage

dans de l'eau de touraillons à  $\frac{M}{200}$  d'arséniate les cellules se présentaient, au bout de quarante-huit heures, sous la forme de petites sphères dont la surface moyenne (3) était  $138,5 \mu^2$ . Au vingt-

(3) Cette surface moyenne a été calculée en mesurant, au microscope, à l'aide du micromètre, le diamètre de 200 globules environ. La surface des sphères de diamètre 3  $\mu$ , 4  $\mu$ , 5  $\mu$ , 6  $\mu$ , 7  $\mu$ , 8  $\mu$ , 9  $\mu$ , 10  $\mu$  et 11  $\mu$  a été multipliée par le nombre des globules du diamètre correspondant



deuxième passage, toutes choses étant égales d'ailleurs, cette surface moyenne était passée à  $176 \mu^2$ . Les pouvoirs fermentatifs et respiratoires correspondant à 1 mg. de levure ont été mesurés à ces différents stades. Les chiffres ramenés à une surface de  $10 \text{ cm}^2$  sont consignés dans le tableau IV. L'examen de ce tableau

TABLEAU IV.

	POUR 1 MG. DE LEVURE		INDICES DE COMPARAISON	
	1 <sup>er</sup> passage	22 <sup>e</sup> passage	1 <sup>er</sup> passage	22 <sup>e</sup> passage
<i>Echanges gazeux ramenés à la quantité de levure sèche :</i>				
Fermentation aérobie. . .	187 mm <sup>3</sup>	144 mm <sup>3</sup>	100	77,3
Respiration . . . . .	22 mm <sup>3</sup>	16 mm <sup>3</sup>	100	72,7
	POUR 10 CM <sup>2</sup> DE SURFACE		INDICES DE COMPARAISON	
	1 <sup>er</sup> passage	22 <sup>e</sup> passage	1 <sup>er</sup> passage	22 <sup>e</sup> passage
<i>Echanges gazeux ramenés à la surface de la levure vivante :</i>				
Fermentation aérobie. . .	91 mm <sup>3</sup>	78,9 mm <sup>3</sup>	100	85,6
Respiration . . . . .	10,7 mm <sup>3</sup>	8,6 mm <sup>3</sup>	100	80,3

montre que les écarts constatés dans la fermentation et la respiration des levures examinées sont du même sens que la grandeur de référence adoptée, soit le poids sec ou la surface des globules.

MODIFICATIONS DE LA COMPOSITION CHIMIQUE. — La densité de la levure traitée ayant été trouvée, dans de nombreux cas, notablement différente de celle de la levure témoin, il était naturel d'examiner la composition chimique des globules. De nombreux dosages comparatifs n'ont permis de déceler que de faibles variations de l'azote et des matières grasses. Par contre, d'importants changements du taux du glycogène ont pu être mis en évidence.

Le glycogène et les gommés ont été dosés par la méthode de Ling Nanji et Paton [23] légèrement modifiée. Voici le mode opératoire adopté.

et la moyenne a été établie à partir de la somme de toutes ces surfaces. Il faut noter que la surface correspondant au diamètre moyen des globules diffère de 5 p. 100, environ, de la surface ainsi calculée.

Les récoltes de levure obtenues à partir de cultures effectuées dans 400 c. c. d'eau de touraillons saccharosée, subissent trois centrifugations et lavages successifs. Le culot de levure provenant de la dernière centrifugation est traité au bain-marie, à l'ébullition, pendant deux heures, par 15 c. c. de potasse à 75 p. 100. Le volume est amené à l'eau distillée chaude à 40 c. c. environ et, après refroidissement, l'on précipite le glycogène et les gommes par addition de 50 c. c. d'alcool à 96°. Après vingt-quatre heures, le précipité est lavé, d'abord à l'alcool à 60°, puis à l'alcool à 96° et, enfin, dissous dans l'eau chaude. Cette solution est neutralisée, ramenée après refroidissement à 100 c. c. et divisée en deux fractions de 50 c. c. Dans l'une de ces fractions, on précipite les gommes, à chaud, par la liqueur de Fehling. Le précipité formé est lavé avec de la soude à 2 p. 100, puis dissous dans l'acide sulfurique à 8 p. 100 à froid. Le liquide provenant de cette opération est chauffé au bain-marie pendant trois heures en même temps que la première fraction de 50 c. c. amenée également à une concentration de 8 p. 100 en acide sulfurique. Après refroidissement et neutralisation, le dosage des sucres par la méthode de G. Bertrand dans la première fraction fournit la teneur en glucides totaux et celui des sucres dans la deuxième fraction, la teneur en gommes. Le taux du glycogène évalué en glucose est égal à la différence entre ces deux chiffres.

Plusieurs auteurs ont montré que la levure emmagasinait d'autant plus de glycogène que le milieu dans lequel elle se développait contenait plus de sucre. Cette particularité a été mise à profit dans les expériences suivantes où la culture des levures a été effectuée dans de l'eau de touraillons contenant 20 p. 100 de saccharose. Dans ces conditions la teneur en glucides totaux de la levure Springer varie peu avec le temps. Voici les chiffres

TABLEAU V. — Glucides exprimés en glucose pour cent de la matière sèche

AGE des cultures	LEVURE SPRINGER TÉMOIN			LEVURE SPRINGER accoutumée à $\frac{M}{100}$ d'arséniate à son 1 <sup>er</sup> passage en milieu sans arséniate		
	Glycogène + gommes	Gommes	Glycogène	Glycogène + gommes	Gommes	Glycogène
2 jours .	20,5	2,4	18,1	14,8	4,6	10,2
3 jours .	20	2,3	17,7	15,5	5,1	10,4
4 jours .	18,6	6	12,6	15,1	6,6	9,5
5 jours .	18,9	4,6	14,3	14,9	8,1	6,8

trouvés du deuxième au cinquième jour de culture, d'une part pour la levure Springer témoin, d'autre part pour la levure



Springer accoutumée à  $\frac{M}{100}$  d'arséniate puis cultivée dans de l'eau de touraillons sans arsenic (tableau V).

On voit que la levure traitée à l'arséniate a perdu, en partie, son aptitude à emmagasiner du glycogène. Le phénomène n'a lieu que pendant les deux ou trois premiers passages en milieu sans arsenic de la levure accoutumée. Dans ces conditions, il peut s'observer dans la majorité des cas. Sans doute doit-on rapporter les exceptions qu'il présente à un retour plus rapide de la levure accoutumée vers le type initial.

**CONCURRENCE VITALE ENTRE LA LEVURE ACCOUTUMÉE ET LA LEVURE TÉMOIN.** — Ces essais sont basés sur la constatation suivante : lorsqu'on repique en milieu sans arséniate la levure accoutumée, le poids moyen sec de ses globules reste inférieur pendant de nombreux passages au poids moyen sec de la levure témoin.

50 c. c. d'eau de touraillons stérile, reçoivent d'une part 35 millions de globules de levure Springer accoutumée, cultivée sans arséniate, d'autre part 35 millions de globules de la levure témoin. Un deuxième flacon de 50 c. c. estensemencé uniquement avec la levure accoutumée cultivée sans arséniate et un troisième uniquement avec la levure témoin. Les trois flacons sont placés à l'étuve à 27°. Au bout de quatre jours, la levure est récoltée et le poids moyen sec des cellules est déterminé par la méthode indiquée précédemment. Voici les chiffres obtenus :

Levure accoutumée, 2 <sup>e</sup> passage sans arséniate. .	$6,2 \times 10^{-8}$ mg.
Levure témoin . . . . .	$8,1 \times 10^{-8}$ mg.
Mélange. . . . .	$7,9 \times 10^{-8}$ mg.

Il ne semble guère possible d'expliquer ce résultat autrement que par l'élimination à peu près complète de la levure accoutumée dès son premier passage en concurrence vitale avec la levure témoin.

Des expériences analogues ont été faites en variant le nombre des passages préalables de la levure accoutumée, sur milieu sans arséniate. Le résultat est constant : le poids moyen sec de la levure provenant du mélange est toujours voisin du poids moyen sec de la levure témoin. En anaérobiose cependant, il se rapproche parfois davantage de celui de la levure à l'arséniate. L'absence d'air favoriserait donc le développement de la levure à l'arséniate.

# RENDEMENTS DE LA POMME DE TERRE ET ASSOCIATIONS VÉGÉTALES DANS CERTAINES STATIONS PYRÉNÉENNES

par JOSEPH BOUGET.

Nous avons fait connaître ici même, à plusieurs reprises, l'état des recherches que nous avons entreprises depuis longtemps sur la tubérisation de la Pomme de terre (1). J. Costantin, qui s'était intéressé à nos résultats, avait entrevu la possibilité de les appliquer à la pratique agricole et nous avait demandé de nous associer avec lui pour tenter de réaliser ces applications. Pour cette tâche, nous nous étions assuré, dès 1933, le concours de M. J. Bouget, botaniste de l'Observatoire du Pic du Midi de Bigorre. Depuis la mort de Costantin (1936), nous avons continué à travailler avec M. Bouget, et, récemment, l'Institut Pasteur lui confiait la charge des expériences que nous poursuivons dans les Pyrénées sur la culture symbiotique de la Pomme de terre. C'est grâce à son habileté technique, à son esprit d'observation et à sa connaissance approfondie de la flore pyrénéenne que nos recherches de laboratoire ont pu s'élargir et pénétrer le domaine de l'Agriculture. Au cours des dix années qu'il a consacrées à ce travail, M. Bouget a accumulé un grand nombre d'observations dont la plupart sont demeurées inédites, et dont il donne un aperçu dans le mémoire ci-dessous. Bien que le sujet touche à la Microbiologie, puisqu'il s'agit de culture de Pomme de terre en symbiose avec des champignons microscopiques, d'aucuns estimeront peut-être que cet article eût été mieux à sa place dans une revue agricole que dans les Annales de l'Institut Pasteur. Il nous a semblé toutefois que les vues ingénieuses et originales de M. Bouget, qui, souvent, ont expliqué et inspiré nos recherches, étaient le complément indispensable de nos propres publications sur le sujet, et c'est à ce titre que nous avons demandé à la Direction de ces Annales de vouloir bien les publier.

J. MAGROU.

\*  
\*\*

Dans une série de publications antérieures (2), nous avons

(1) J. MAGROU, ces *Annales*, 1918, 32, 37 ; 1941, 66, 249 ; 1943, 69, 112. — J. MAGROU, J. CUZIN et F. MARIAT, *ibid.*, 1943, 69, 114.

(2) J. BOUGET, *C. R. Acad. Sci.*, 1934, 199, 1154. — J. COSTANTIN, J. MAGROU, J. BOUGET et V. JAUDEL, *ibid.*, 1934, 199, 1195. — J. COSTANTIN, J. BOUGET et J. MAGROU, *ibid.*, 1934, 199, 1547. — J. et Ch.

indiqué les résultats de nos premiers essais de culture en montagne de la Pomme de terre, entrepris en 1933 à l'instigation du regretté Professeur J. Costantin. Ces essais ont abouti à la mise au point d'une méthode de culture à partir de graines, que nous estimons propre à lutter contre les maladies à virus. Les tubercules provenant de nos plants de semis (tubercules *primaires*) ont été distribués comme semences aux agriculteurs de la région de Bagnères-de-Bigorre (vallée de l'Adour, vallées, collines et montagnes avoisinantes). Nous croyons devoir donner aujourd'hui un aperçu des rendements obtenus avec ces semences.

Rappelons que nos semis de graines ont été faits à Bagnères-de-Bigorre, dans de la terre provenant des régions incultes de la haute montagne et choisie d'après les caractères de la flore spontanée qui s'y développait. Cette terre « vierge » était additionnée d'une certaine proportion de sable et d'argilo-calcaire. Dès que les plants atteignaient une vigueur suffisante, ils étaient repiqués en pleine terre, en montagne, dans des prairies récemment défrichées.

En 1937, année que nous prendrons comme exemple, nous avons distribué aux nombreux propriétaires de la région qui nous en ont fait la demande 1.430 tubercules « primaires » de nos semis de 1936 faits sous cages grillagées et appartenant à 12 variétés différentes (3). Ces tubercules ont été plantés, par les soins de ces propriétaires, dans 9 localités distinctes. Pour apprécier le rendement, nous avons prélevé *au hasard*, dans l'ensemble des plantations, un total de 85 pieds ; la récolte de chacun de ces pieds a été pesée séparément. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-contre où la colonne de gauche donne les divers rendements obtenus par pied, et la colonne de droite la fréquence, ou nombre de pieds ayant donné chacun de ces rendements.

On voit par là que, sur les 85 pieds dont la récolte a été pesée, 75, soit 88 p. 100, ont donné des rendements compris entre 1 kg. et 3,500 kg. par pied, soit des rendements élevés ou très élevés, surtout si l'on tient compte du fait que les plantes qui les ont produits provenaient de tubercules primaires de taille souvent très réduite. Au cours des autres années, comprises entre 1935 et 1940, les rendements obtenus par les cultivateurs ont été de même ordre qu'en 1937, année prise comme exemple.

Il nous est arrivé, avec certaines variétés, d'obtenir des rendements plus élevés encore. C'est ainsi que 6 pieds de « triumph »,

BOUGET, *ibid.*, 200, 1240. — J. et Ch. BOUGET, *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 1935, 10<sup>e</sup> série, 47, 51. — J. DUFRÉNOY et J. BOUGET, *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 1937, 10<sup>e</sup> série, 49, 181.

(3) Violette du Peyras (variété de la Géante bleue), Wohltmann, Chardonne, Cellini, Up to date, Majestic, variété spontanée de Roquelaur (Gers), Institut de Beauvais, Triumph, Maréchal Franchet d'Esperey, Quarantaine de la Halle, Pepo.



provenant de tubercules primaires, récoltés en 1934 et plantés le 27 avril 1935, ont donné respectivement à l'arrachage (24 septembre), les rendements suivants : 2 kg., 1,5 kg., 2 kg., 2,5 kg., 3 kg., 3,6 kg. (soit 2,416 kg. comme rendement moyen par pied).

RENDEMENTS par pied (en kilogrammes)	NOMBRE DE PIEDS ayant donné les rendements ci-contre
0,5 . . . . .	2
0,6 . . . . .	1
0,7 . . . . .	4
0,8 . . . . .	2
0,9 . . . . .	1
1,0 . . . . .	12
1,1 . . . . .	6
1,2 . . . . .	13
1,3 . . . . .	3
1,4 . . . . .	5
1,5 . . . . .	12
1,6 . . . . .	1
1,8 . . . . .	4
2,0 . . . . .	11
2,2 . . . . .	1
2,5 . . . . .	2
3,0 . . . . .	3
3,5 . . . . .	2
Total . . . . .	85

Toutefois, dans certains cas, nous avons observé des rendements nettement inférieurs aux précédents. C'est ainsi qu'en 1937, soit l'année même où nous avions obtenu les bons rendements signalés ci-dessus, nous relevons, non plus chez les cultivateurs, mais dans l'un de nos champs d'expérience (station des Argagnats), les rendements moyens par pied suivants :

0,276 kg. (Pomme de terre sauvage de Roquelaure) ; 0,933 (Chardonne) ; 0,375 (Wohltmann) ; 0,516 (Violette du Peyras) ; 0,741 (Cellini) ; 0,950 (Majestic) ; 1,150 (Up to date ; cette variété a produit un rendement satisfaisant, malgré une forte attaque de mildiou).

Parallèlement à ces essais, nous en avons poursuivi d'autres, dans les mêmes conditions, avec des tubercules sélectionnés achetés dans le commerce ou fournis par les services agricoles, et nous avons observé dans les rendements les mêmes fluctuations qu'avec les tubercules primaires provenant de nos semis de graines. Ces fluctuations nous paraissent relever de plusieurs facteurs :

1° *Variétés*. — Tandis que certaines variétés, telles que Triumph, Chardonne, Imperator, Institut de Beauvais donnent, sur certains coteaux des environs de Bagnères des rendements exceptionnellement élevés, d'autres donnent des rendements plus faibles. C'est le cas, notamment, de la Pomme de terre retournée à l'état spon-

tané à Roquelaure [Gers] (4), qui, dans sa station d'origine, donne, sans la moindre intervention de l'homme, des rendements importants, tandis que sa production est relativement faible dans nos montagnes.

2° *Altitude*. — Bagnères est situé à 550 m. d'altitude au milieu de la vallée de l'Adour, entre les premiers contreforts du Pic du Midi et la plaine de Tarbes. A l'est et à l'ouest se déroulent les contreforts de la chaîne, dont les points culminants varient entre 800 et 1.000 m. : zone montagneuse recouverte de cultures, bois, pâturages ou friches. Vers le haut de la vallée, les cultures pénètrent dans la zone subalpine et s'arrêtent vers 1.400 m. Dans cette bande de 550 m. à 1.400 m. au-dessus du thalweg, les champs de pommes de terre sont étagés dans les conditions les plus diverses d'exposition et de terrain.

3° *Etat sanitaire*. — Nous avons déjà attiré l'attention sur la distribution des pucerons en montagne et sur la corrélation qui existe entre la rareté de ces insectes et un état sanitaire satisfaisant des cultures de Pomme de terre (5). Quand on cultive une même variété, provenant d'un même lot de semence, dans divers champs, situés sur une bande de terrain de même nature, sensiblement à la même altitude, on constate que dans certains de ces champs la végétation de la Pomme de terre est plus belle, plus régulière, et le rendement plus fort. La belle végétation et les gros rendements se produisent toujours sur les crêtes et les hauts reliefs exposés aux vents dominants. Or dans les stations ainsi exposées le vent empêche les pucerons transmetteurs de virus de se maintenir et de se propager. Au contraire, dans les fonds des vallées, dans les dépressions et sur les versants abrités des vents, les pucerons abondent, et, corrélativement, l'état sanitaire est moins bon et les rendements sont plus faibles. La Pomme de terre est pourtant une plante molle, qui demanderait plutôt un habitat abrité. En lutte contre deux éléments nocifs, vents et pucerons, elle supporte mieux la rigueur des premiers que les attaques des seconds.

4° *Nature du sol*. — Le sol de la vallée est formé par des alluvions descendues des cimes environnantes ; c'est un terrain riche (le maïs y atteint jusqu'à 2,50 m.). A l'est et à l'ouest, les chaînons latéraux sont constitués par le jurassique ou le crétacé très métamorphisés, avec enclaves de granit, d'ophite, etc... C'est un terrain extrêmement favorable à la culture de la Pomme de terre et surtout à la tubérisation du plant. Au sud de Bagnères, vers le haut de la vallée, les champs de pommes de terre sont établis sur les atterrissements des terrains primaires qui donnent en général une végétation luxuriante.

(4) J. BOUGET, *C. R. Acad. Sci.*, 1935, **201**, 1418.

(5) J. BOUGET, *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **202**, 341.

Les rendements exceptionnels que nous avons signalés sur certains coteaux des environs de Bagnères (jusqu'à 4 à 5 kg. par pied en moyenne pour les variétés « Institut de Beauvais » et « Chardonne »), nous ont conduit à réaliser l'expérience suivante, avec la terre d'une de ces stations.

La terre choisie pour cette expérience provenait d'une châtaigneraie et d'une friche attenante à cette châtaigneraie, situées sur le haut d'un coteau vers 800 m. d'altitude, à 7 km. environ de Bagnères. Cette terre ayant été prélevée sur place et transportée à Bagnères, nous y avons semé, le 12 avril 1935, des graines de deux variétés : « Maréchal Franchet d'Esperey » et « Quarantaine de la Halle ». De chaque variété, on n'a laissé en place qu'un pied, les autres ont été repiqués ailleurs. Un seul buttage a été fait. A l'arrachage, qui a eu lieu le 6 novembre, on a constaté pour les deux pieds laissés en place les rendements suivants :

« Maréchal Franchet d'Esperey » . . . . .	24 tubercules.
« Quarantaine de la Halle » . . . . .	22 tubercules.

Des plants provenant des semis précédents ont été repiqués le 28 mai, puis transplantés, le 1<sup>er</sup> juillet, dans des champs situés au voisinage immédiat de la châtaigneraie où la terre avait été prélevée. L'arrachage a été fait le 25 octobre.

*Rendement.* — « Maréchal Franchet d'Esperey » : 6 pieds ont donné 170 tubercules. Moyenne de tubercules par pied : 28.

« Quarantaine de la Halle » : 6 pieds ont produit 115 tubercules. Moyenne de tubercules par pied : 19.

Encouragé par ces résultats, nous avons procédé récemment à un essai sur une grande échelle. Des graines de Pomme de terre ont été semées au printemps dernier dans une serre de multiplication, à Bagnères-de-Bigorre. Les semis ont été faits en caisses, dans de la terre provenant d'une friche attenante à la châtaigneraie dont nous venons de parler. Les graines ont levé et ont donné des plantes vigoureuses, qui ont été transplantées, au nombre de 3.607, en pleine terre, dans la friche où la terre avait été prélevée, au lieu dit « Le Courtalet » (6). La récolte, faite le 11 novembre 1942, a donné 25.261 tubercules, soit 7 tubercules par pied en moyenne, mais il faut tenir compte du fait que, sur les 3.607 pieds transplantés, beaucoup ont péri après le repiquage, par suite de la sécheresse qui sévissait à ce moment, à laquelle les circonstances actuelles ne nous ont pas permis de remédier par des arrosages. Si bien qu'au moment de l'arrachage, le nombre moyen de tubercules par pied, chez les plants restés en bon état, oscillait de 18 à 30. Ces tubercules étaient d'une grosseur que nous n'avions jamais observée jusqu'ici chez des plantes issues de semis : beau-

(6) J. MAGROU, J. BOUGET et G. SEGRETAI, *C. R. Acad. Sci.*, 1943, 216.



coup d'entre eux avaient la taille d'un gros tubercule ordinaire (jusqu'à 9 cm. de long pour 4,5 cm. de diamètre).

La châtaigneraie qui a fourni la terre utilisée dans ces expériences était saine et vigoureuse. L'emploi de cette terre nous a été suggéré par des observations que nous avons faites depuis longtemps et qui peuvent se résumer comme il suit :

Le Châtaignier n'est pour nous que le repère d'un terrain siliceux spécial dans lequel cet arbre se développe dans les meilleures conditions, mais qui porte en même temps que lui un grand nombre d'autres plantes. Certaines de ces plantes sont les espèces vulgaires de la plaine et des coteaux environnants ; elles sont généralement peu développées sous des Châtaigniers vigoureux ; ceux-ci semblent repousser loin d'eux les espèces envahissantes de la brousse (Fougères, Ronces, Bruyères, Ajoncs, etc.) ; nous les laisserons de côté.

D'autres, dont nous donnons plus loin la liste, constituent la riche flore de la belle châtaigneraie ; la plupart sont localisées dans la châtaigneraie même et à ses alentours (7). Certaines sont des échappées de la haute région, leur présence paraît extraordinaire à l'altitude considérée. Toutes ces espèces constituent comme un réactif du terrain dont nous parlons, celui dans lequel la châtaigneraie atteint toute sa vigueur.

Lorsque la châtaigneraie dépérit, les plantes dont il s'agit deviennent de moins en moins nombreuses et finissent par disparaître, à mesure que le dépérissement des Châtaigniers progresse ; les plantes communes dont nous parlions tout à l'heure reprennent peu à peu possession du terrain et finissent par tout envahir. C'est alors qu'apparaissent les symptômes de la maladie de l'encre, à laquelle on attribue d'habitude la disparition des Châtaigniers ; mais celle-ci ne paraît être qu'un phénomène secondaire, parce que l'on voit des cas nombreux où les arbres sont frappés d'une mort rapide, sans que la maladie de l'encre se manifeste. En réalité la disparition progressive de la flore caractéristique, accompagnée du dépérissement des Châtaigniers, donne l'impression qu'il se passe dans le sol un phénomène particulier, d'apparence mystérieuse.

Pour essayer d'éclaircir ce mystère, on pourrait remarquer que le dépérissement des Châtaigniers, leur envahissement par la maladie, se produit surtout au voisinage des terres cultivées où l'influence de l'homme et du bétail se manifeste ; tandis que les arbres qui sont au milieu des prairies, dans les pâturages, dans des friches et des bois, restent sains et vigoureux ; peut-être l'influence des terres vierges agit-elle ici comme dans le cas de la Pomme de terre.

(7) Nous avons signalé, avec M. Magrou et M<sup>lle</sup> Douchez, l'abondance des mycorhizes dans cette flore spéciale (*C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 226).

LISTE DES ARBUSTES ET DES PLANTES HERBACÉES  
CANTONNÉS DANS LE TERRAIN A CHATAIGNERAIE.

1° Arbustes. — *Adenocarpus complicatus* (assez commun); *Genista sagittalis* (rare; stations isolées); *Cytisus supinus* (assez commun); *Erica arborea* (rare dans ce terrain, pieds isolés); *Erica tetralix* (stations rares); *Vaccinium myrtillus* (le meilleur réactif de ce terrain; espèce la plus commune après *Calluna vulgaris*, *Pteris aquilina* et *Ulex nanus*).

2° Plantes herbacées. — *Erythronium dens canis* (espèce alpine, très abondante; très difficile à cultiver); *Narcissus bulbocodium* (très commun; difficile à maintenir dans les jardins); *Crocus nudiflorus* (plante extrêmement abondante, localisée en stations jusque dans la région alpine); *Scilla verna* (très commune, par stations étagées jusqu'à la zone alpine); *Wahlenbergia hederacea* (commun, peu cultivable); *Blechnum spicant* (commun, non cultivable); *Lilium martagon* (subalpine et alpine; assez rare à cette altitude); *Lathyrus macrorhizus* [= *Orobis tuberosus*] (très commun, souche très rameuse à gros renflements); *Serratula tinctoria* (assez commun, remonte dans les pâturages alpins); *Arnica montana* (alpine; stations dispersées, rebelle à la culture); *Polygala depressa* (commun); *Gentiana pneumonanthe* (commun); *Potentilla procumbens* (très commun, se multiplie aussi par petits tubercules); *Veronica montana* (subalpine, assez rare); *Lycopodium clavatum* (dans les friches autour des Châtaigneraies); *Digitalis purpurea* (commun; par localités); *Doronicum austriacum* (alpine; stations rares); *Gentiana lutea* (quelques pieds çà et là; sans floraison, réfractaire à la culture); *Jasione perennis* (alpine, très localisée).

En résumé, les tubercules de Pomme de terre obtenus par semis de graines dans les terrains montagneux qui environnent Bagnères-de-Bigorre, donnent, chez les cultivateurs à qui nous les distribuons, des rendements généralement élevés. Toutefois, tant avec ces tubercules qu'avec les semences sélectionnées par la méthode classique, on observe dans les rendements des fluctuations qui tiennent à la variété, à l'altitude, à l'abondance ou à la rareté des pucerons et à l'état sanitaire qui en découle, à la nature du sol. Les terrains favorables sont caractérisés par des associations végétales très spéciales, dont nous donnons un aperçu et dont l'étude nous a guidé dans nos recherches sur la Pomme de terre. Avec M. Dauzère, nous avons étudié la constitution géologique de ces terrains dans ses rapports avec l'électricité atmosphérique [orages, ionisation de l'air] (8), avec M. Magrou, nous en poursuivons actuellement l'étude biologique.

(8) C. DAUZÈRE et J. BOUGET, *Bull. Soc. Ramond*, 1908, 1916; *C. R. Congrès Soc. Savantes*, 1925; *C. R. Acad. Sc.*, 1928, 186, 1565 et 1744; 1930, 490, 1574.

## SUR LE MAGNÉSIUM CONTENU DANS L'EAU DE PLUIE RÉCOLTÉE A GRIGNON

par GABRIEL BERTRAND.

J'ai été conduit, par une série de recherches antérieures, à me préoccuper de la composition chimique de l'eau de pluie, l'étude approfondie de cette composition paraissant devoir intéresser au plus haut point l'importante question du cycle des éléments à travers le monde minéral et le monde vivant, intervenir dans la solution de nombreux problèmes ayant trait au développement et à la santé des plantes, des animaux et de l'homme.

Mon premier objectif, quand j'ai abordé cette étude, a été la détermination beaucoup plus précise qu'on l'avait faite jusqu'alors de la quantité de soufre tenue en dissolution dans les eaux météoriques. J'ai montré alors que les méthodes en usage pour effectuer cette détermination comportaient une cause d'erreur en plus relativement si grave qu'elle pouvait aller jusqu'à fournir des chiffres positifs en l'absence totale du métalloïde (libre ou combiné). J'ai pu établir ensuite, à l'aide d'une méthode appropriée, que l'eau de pluie renferme ordinairement du soufre dissous à l'état de sulfate, qu'à l'Ecole nationale de Grignon, par exemple, située à 30 kilomètres de Paris, la proportion moyenne annuelle de ce métalloïde atteint environ 2,5 mg. par litre, chiffre non négligeable au point de vue de la nutrition des plantes cultivées (1).

Mon attention s'est portée dans la suite sur d'autres éléments, en particulier sur le magnésium, auquel ce mémoire est surtout consacré.

Mais il est nécessaire, pour permettre d'enchaîner les nouvelles expériences aux précédentes, de rappeler les conditions dans lesquelles avaient eu lieu la récolte de l'eau de pluie et la méthode de dosage du soufre qui avait été employée.

L'eau était reçue directement dans de grandes éprouvettes cylindriques de verre, de 50 cm. de hauteur et d'environ 13,5 cm. de diamètre, partiellement enterrées dans le champ d'expériences de l'Ecole nationale d'Agriculture de Grignon. L'ouverture des éprouvettes était située à 40 cm. au-dessus du sol. Pour éviter que des particules de terre rebondissent dans l'intérieur, lors de fortes averses, la surface du sol était recouverte autour de chaque réci-

(1) Ces *Annales*, 1936, 56, 5-9.



pient d'une couche épaisse de paille (2). La durée de la récolte avait été fixée à douze mois consécutifs. Ce temps écoulé, comme il n'aurait guère été possible de transporter les éprouvettes, sans risques de perte ou de souillure, du champ d'expériences de Grignon au laboratoire de Paris, on a transvasé le produit total des récoltes, liquide et matières solides en suspension, dans de grands flacons, en s'aidant d'un entonnoir et en entraînant pour finir les dernières particules solides avec de l'eau pure (3). Pendant l'hiver, une certaine proportion d'alcool pur a dû être ajoutée afin de prévenir le gel de l'eau déjà rassemblée et la rupture des éprouvettes. Pendant la saison chaude, de petites algues et des infusoires se sont développées aux dépens des substances dissoutes. Il a fallu tenir compte de l'apport éolien des poussières, composées principalement de sable et d'argile, et de la formation des microorganismes pour décider du choix de la méthode d'analyse et pour interpréter en toute connaissance de cause les résultats obtenus.

Après une année allant du 1<sup>er</sup> mai 1934 au 30 avril 1935, le contenu d'une éprouvette a été introduit dans un ballon distillatoire, avec toutes les matières solides qui s'y trouvaient.

L'eau a été évaporée à sec, par distillation au bain-marie sous pression réduite et le résidu chauffé avec un peu d'acide azotique fumant, jusqu'à ce que les matières organiques aient été dissoutes et qu'il n'y ait plus eu en suspension que des matières minérales. On a décanté alors le contenu du ballon dans une capsule de porcelaine, évaporé au bain-marie électrique la plus grande partie de l'acide, additionné le résidu pâteux d'un excès de carbonate de sodium ; s'aidant d'une spatule de platine et, à la fin, d'un peu d'eau, la masse solide a été transvasée dans un creuset de nickel ; on a ajouté encore un peu d'un mélange de carbonates et de nitrates alcalins et l'on a chauffé jusqu'à fusion tranquille, comme pour le dosage total du soufre dans une plante ou de la terre arable (4). L'attaque terminée, la masse a été refroidie, puis désagrégée par dissolution aqueuse dans le creuset même, au bain-marie ; liquide et solide ont été versés dans une capsule de porcelaine ; on a acidifié avec de l'acide chlorhydrique et évaporé à sec, pour insolubiliser la silice. Celle-ci, recueillie par filtration, bien lavée par délayage dans l'eau chargée d'acide chlorhydrique, puis dans l'eau pure, a été séchée, calcinée et pesée.

(2) Cette précaution n'a pas empêché, naturellement, l'apport d'une certaine quantité de poussières organiques et surtout minérales par le vent.

(3) Je remercie M. J. Guérillot, professeur à l'Ecole nationale d'Agriculture de Grignon, de l'aide aimable et éclairée qu'il m'a apportée pour la récolte de l'eau.

(4) *Annales Sc. agron.*, 1930, 47, 319 et 1927, 44, 71.

Les oxydes d'aluminium et de fer ont été éliminés de la solution filtrée par l'ammoniaque et c'est dans la liqueur ainsi préparée que l'acide sulfurique total a été précipité quantitativement par le chlorure de baryum.

\*  
\* \*

Le dosage terminé, au lieu de jeter les eaux-mères et de lavage du sulfate barytique, j'en ai examiné la composition. C'est ainsi que j'y ai rencontré une proportion notable de magnésium : 0,0473 g. dans le contenu entier de l'éprouvette.

L'eau distillée, l'alcool et tous les réactifs utilisés au cours des opérations ayant été purifiés par moi, cette proportion de magnésium a retenu mon attention. J'ai d'abord supposé, ce qui était *a priori* très vraisemblable et, en tous cas, le plus simple, que le magnésium trouvé avait pour origine essentielle les matières minérales provenant du sol situé au voisinage de l'éprouvette et transportées à l'intérieur par le vent.

Pour apprécier la valeur de cette supposition, j'ai eu recours à une analyse comparative. Un échantillon de la terre incriminée, de nature sablonno-argileuse, à peu près exempte de calcaire et ne contenant que peu de cailloux et de graviers, a été séché à l'air, passé au tamis à mailles de 1 mm. et mis à l'étuve à 100-105°. L'analyse a porté sur une prise d'essai de 2,455 g., réduit par un chauffage au rouge naissant, dans une capsule de platine, à 2,365 g.

Le résidu de l'incinération a été arrosé, dans la capsule de platine, avec de l'acide azotique jusqu'à imbibition complète. Il n'y a presque pas eu d'effervescence. On a ajouté peu à peu, en mélangeant, 10 g. d'un mélange équimoléculaire de carbonates secs de potassium et de sodium, ce qui a donné une masse friable, que l'on a chauffée progressivement sur un fort brûleur de Bunzen jusqu'à la fusion. Quand la réaction a été terminée, on a laissé refroidir, plongé la capsule de platine dans une grande capsule de porcelaine contenant de l'eau ; on a chauffé jusqu'à dissolution-désagrégation de la masse saline, acidifié fortement par l'acide chlorhydrique, enlevé la capsule de platine et évaporé à sec au bain-marie, puis à l'étuve à 105-110°. Enfin, on a séparé successivement, avec tous les soins voulus, la silice, les oxydes d'aluminium et de fer, le calcium et le magnésium (5). Les chiffres suivants ont été obtenus :

(5) J'ai suivi, pour la séparation quantitative et pour l'identification du magnésium, la technique qui m'avait servi dans mes expériences « Sur la présence actuellement contestée du magnésium dans les grains de pollen », ces *Annales*, 1940, 65, 119-129.

Perte par incinération . . . . .	4,07	p. 100
Silice . . . . .	76,26	—
Oxydes d'Al et de Fe . . . . .	12,06	—
Calcium . . . . .	6,92	—
Magnésium . . . . .	0,49	—

Il n'avait pas été possible de doser directement les poussières minérales contenues dans l'éprouvette, mais on peut les évaluer en comparant les quantités de silice et d'oxydes alumino-ferrique qu'elles renferment avec celles de la terre du champ d'expériences de Grignon. A l'analyse, le contenu total de l'éprouvette avait donné :

Silice . . . . .	5,444 g.
Oxydes d'Al et de Fe . . . . .	0,889 g.
Calcium . . . . .	0,300 g.
Magnésium . . . . .	0,0473 g.

soit un total de silice et d'oxydes alumino-ferrique de 6,333 g. Comme la terre renferme, dosées dans les mêmes conditions, 88,32 p. 100 de ces substances, il devait y avoir dans l'éprouvette  $\frac{6,333 \text{ g.} \times 100}{88,32} = 7,17 \text{ g.}$  de poussières minérales supposées

provenir de la terre. On calcule alors que ces poussières n'auraient pu apporter qu'un poids de magnésium égal à  $\frac{0,49 \times 7,17}{100}$ , c'est-

à-dire de 0,0351 g. Si donc tous les dosages sont corrects, il devait y avoir dans l'éprouvette : 0,0473 g. — 0,0351 g. = 0,0122 g. de magnésium d'une autre origine que les poussières terrestres.

\*  
\* \*

Cette constatation m'a amené à chercher si du magnésium ne provenait pas directement de l'eau de pluie. En conséquence, j'ai analysé le contenu d'une autre éprouvette, mais en opérant, cette fois, séparément sur le liquide et sur le dépôt. En outre, au lieu d'attaquer ce dépôt par fusion alcaline, opération qui libère, principalement à cause du sable, une grande quantité de silice nuisible à la précision du dosage des éléments métalliques, je l'ai incinéré puis traité par l'acide chlorhydrique, dans des conditions où ne pouvaient échapper à la dissolution que des formes très résistantes de magnésium.

Le liquide a été filtré à travers un filtre à plis en papier Berzélius, la partie insoluble étant entraînée sur le filtre par les lavages, effectués à l'eau pure.

ANALYSE DU LIQUIDE FILTRÉ. — Les 2 litres, à peu près, du liquide de l'éprouvette avec, en plus, les eaux de lavage, ont d'abord été concentrés dans une capsule de porcelaine à 200 c. c. environ.



Comme j'ai voulu profiter de l'occasion pour doser aussi le chlore des chlorures, la concentration a été faite en présence de 0,100 g. de carbonate de sodium pur. L'évaporation a été terminée dans une capsule de platine. Le résidu sec a été porté ensuite dans un four à moufle et carbonisé à fond à une température atteignant au plus le rouge naissant. La masse charbonneuse refroidie a été lessivée à l'eau bouillante, et, dans la solution, filtrée et acidifiée par l'acide azotique en présence d'hélianthine, on a ajouté un léger excès d'azotate d'argent. On a obtenu 0,1525 g. de chlorure d'argent contenant 0,0253 g. de chlore.

Après avoir constaté que l'eau-mère du chlorure d'argent, débarrassée de l'excès d'argent par  $\text{ClH}$ , contenait une petite quantité de silice : 0,0078 g. et seulement des traces négligeables de calcium et de magnésium, je suis passé à l'examen du charbon lessivé de l'opération précédente. Ce charbon, avec le filtre dans lequel il s'en trouvait une partie, a été calciné dans la capsule de platine. Aux cendres on a ajouté le lavage chlorhydrique de la capsule de porcelaine qui avait servi au commencement de la concentration de l'eau filtrée (6). Après évaporation à sec et calcination, il a été procédé successivement à la séparation quantitative de la silice, de l'oxyde de fer et de l'alumine, du calcium et enfin du magnésium.

**ANALYSE DU DÉPÔT.** — Le dépôt ne renfermait pas seulement des matières minérales, sable et argile, mais, comme il a déjà été signalé plus haut, des microorganismes, en particulier des algues vertes, qui s'étaient développées peu à peu aux dépens de l'eau et des autres substances contenues dans l'éprouvette. Ces végétations étaient assez abondantes ; elles avaient nécessairement assimilé une certaine proportion du magnésium dissous, lequel ne devait se retrouver que dans leurs cendres.

En conséquence, le filtre à plis qui avait servi à clarifier l'eau avant son analyse, a été séché puis calciné avec le dépôt qui s'y trouvait. La calcination a été faite dans une capsule de platine, à la température du rouge naissant. Le résidu a été arrosé d'acide chlorhydrique concentré ; on a évaporé à sec au bain-marie, repris par un peu d'acide chlorhydrique et de l'eau chaude, filtré, lavé, séché et calciné la partie insoluble. Cet insoluble était formé presque entièrement par du sable siliceux, mais renfermait aussi un peu de silice floconneuse et d'argile cuite ayant résisté à l'attaque acide. Dans la solution filtrée, l'analyse a été poursuivie comme dans les cas déjà examinés.

Les chiffres suivants ont été obtenus :

(6) Sur la paroi interne de laquelle s'était formé un petit dépôt adhérent de carbonates de Ca et de Mg, à cause du carbonate sodique ajouté.

	DANS LE LIQUIDE	DANS LE DÉPÔT	AU TOTAL
Chlore . . . . .	0,0253 g.		0,0253 g.
Insoluble dans ClH. . . . .	0,0165 g.	6,5987 g.	6,6062 g.
Oxydes d'Al et de Fe. . . . .	0,0081 g.	0,6010 g.	0,6091 g.
Calcium . . . . .	0,0884 g.	0,2029 g.	0,2913 g.
Magnésium . . . . .	0,0043 g.	0,0339 g.	0,0382 g.

ANALYSE COMPARATIVE DE LA TERRE ENVIRONNANTE. — Cette fois encore, j'ai cherché ce que la terre de Grignon prélevée au voisinage de l'éprouvette et traitée de la même manière que le dépôt pouvait avoir cédé de magnésium aux réactifs, quelle part du magnésium trouvé dans l'analyse du contenu de l'éprouvette était, par suite, attribuable aux poussières terrestres apportées par le vent.

L'attaque d'un échantillon de terre séchée à 105-110° et pesant 2,505 g. a été faite par l'acide chlorhydrique concentré, c'est-à-dire dans les mêmes conditions que celles des cendres du dépôt de l'éprouvette, et non plus par fusion avec le mélange de carbonates de potassium et de sodium, comme dans la première expérience. Voici les chiffres trouvés :

Perte par incinération . . . . .	4,40 p. 100
Insoluble dans ClH . . . . .	86,65 —
Oxydes d'Al et de Fe . . . . .	4,75 —
Calcium . . . . .	1,68 —
Magnésium . . . . .	0,29 —

D'où il résulte que 100 g. de terre ont donné 91,40 du mélange d'insoluble dans l'acide chlorhydrique et d'oxydes d'aluminium et de fer, qu'une partie de ce mélange équivaut à 1 partie 094 de terre et à 0,00317 g. de magnésium.

En supposant, comme au sujet de la première récolte météorologique, que le dépôt minéral de l'éprouvette soit formé de la terre environnante, on calcule qu'il aurait pu fournir à l'analyse 0,0229 g. de magnésium.

Or, il en a été trouvé 0,0382 g.

Cette fois encore le contenu total en magnésium de l'eau recueillie, des végétations qui s'y sont développées et du dépôt minéral est supérieur à la quantité de magnésium que le dépôt minéral seul aurait pu fournir à l'analyse s'il avait été constitué par de la terre.

\*  
\* \*

Je me suis demandé, avant de tirer une conclusion ferme de ces résultats, quelle part du magnésium contenu dans le liquide filtré pouvait venir de l'action dissolvante de l'eau sur les poussières terrestres tombées au jour le jour dans les éprouvettes et même sur le verre de ces éprouvettes.

**ACTION DE L'EAU PURE SUR LA TERRE DE GRIGNON.** — Pour répondre à la première des ces questions, 6 g. de terre fine de Grignon, non calcinée, ont été introduits dans un flacon de 3 litres à bouchon de verre rodé, avec 2.400 g. d'eau redistillée sous pression réduite dans un appareil de verre. Ce flacon avait été préalablement lavé à l'acide azotique et à l'eau redistillée.

Pendant quinze jours, le flacon et son contenu ont été agités, de huit à dix fois chaque jour, à raison de 100 secousses chaque fois. A cause de la pureté de l'eau, les particules terreuses ne se sont jamais déposées entièrement dans les intervalles des agitations, même durant les nuits. De sorte que l'action de l'eau sur ces particules a pu s'exercer beaucoup mieux encore que dans les éprouvettes servant à la récolte de l'eau de pluie, où les poussières étaient toujours au fond.

Après les quinze jours, un total de 11.500 secousses et un repos complet de vingt-quatre heures, le liquide encore trouble, surnageant la partie sablonneuse du dépôt, a été filtrée sur deux filtres à plis en papier Berzélius. On a dû repasser le liquide à plusieurs reprises à travers les filtres jusqu'à ce que, les pores du papier étant suffisamment colmatés, il passât à peu près limpide comme de l'eau.

On a évaporé au fur et à mesure 2.000 c. c. de ce liquide, correspondant à 5 g. de terre, dans une capsule de platine (7). Il est resté 0,076 g. de résidu qu'un passage au four à moufle à la température du rouge naissant a réduit à 0,057 g. Ce résidu a été additionné de 2 c. c. d'acide chlorhydrique pur, ce qui a produit une petite effervescence, et, après évaporation au bain-marie et dessiccation à l'étuve à 105-110°, l'analyse a donné :

Insoluble dans ClH. . . . .	0,0117 g.
Oxydes d'Al et de Fe . . . . .	0,0011 g.
Calcium . . . . .	0,0163 g.
Magnésium. . . . .	0,0004 g.

Cette quantité de magnésium est très au-dessous de celle qui a été rencontrée dans l'eau météorique filtrée. Si l'on compare les résultats, on trouve en effet :

a) Dans l'expérience-témoin, 2 litres d'eau pure ont agi, durant quinze jours, sur 5 g. de terre. L'action de cette eau a eu lieu depuis le commencement jusqu'à la fin de l'expérience sur la totalité de la terre. En outre, une agitation fréquente a maintenu les fines particules, les plus attaquables, presque entièrement et

(7) Les entonnoirs étaient recouverts d'une capsule de verre renversée, mais comme la filtration a duré quatre jours, il y a eu une évaporation de 60 g. d'eau, soit de 3 p. 100. L'analyse a donc porté sur environ 2.060 g. de liquide filtré et non sur 2.000. Etant donné la petitesse des poids de substances dissoutes, il n'a pas été tenu compte de cette différence dans le calcul des résultats.



continuellement en suspension. Il s'est dissous 0,4 g. de magnésium.

b) Dans l'éprouvette venant du champ d'expérience, il y avait, au moment de la récolte, près de 2 litres de liquide et un dépôt de sable et de terre pesant environ 7 g. Ce sable et cette terre n'avaient été apportés par le vent que peu à peu, au cours de l'année; ils s'étaient déposés au fur et à mesure au fond du liquide et n'avaient eu avec lui qu'un contact très limité. Néanmoins, la quantité de magnésium trouvée en solution égalait 4,8 mg., chiffre environ huit fois plus élevé, en tenant compte du poids du dépôt, que dans le liquide de l'expérience de laboratoire.

ACTION DE L'EAU SUR LE VERRE DE L'ÉPROUVETTE. — Pour répondre à la seconde question, 4 litres d'eau redistillée ont été versés dans l'éprouvette, celle-ci ayant été, comme avant une récolte, brossée, passée à l'acide chlorhydrique et lavée à l'eau pure. Une fois garnie d'eau, l'ouverture a été recouverte d'un carré de papier Berzélius débordant de quelques centimètres et d'un cristalliseur renversé, lavé lui aussi à l'acide et à l'eau.

L'éprouvette ainsi préparée a été placée à l'extérieur d'une fenêtre du laboratoire, en plein midi, le 30 juillet. On l'y a laissée jusqu'au 30 octobre suivant, c'est-à-dire trois mois pleins.

L'eau est restée parfaitement incolore et limpide, sans aucun développement visible à l'œil nu de microorganismes. Il s'y était seulement introduit, huit à dix jours avant la dernière date, un petit essaim d'insectes blancs et semi-translucides, comprenant une douzaine d'individus, dont la plupart étaient encore vivants. Ces insectes, des podurelles, surnageaient le liquide et il avait été très facile de les enlever avec un agitateur de verre.

L'eau a été évaporée dans une capsule de platine, en présence de 0,200 g. de carbonate sec de sodium pur. Le résidu a été traité directement dans la capsule par l'acide chlorhydrique. Après évaporation à sec, on a repris par une petite quantité d'eau acidulée, ce qui a permis de séparer 0,0005 g. de silice. Dans la solution, il n'a été obtenu aucun précipité alumino-ferrique par l'ammoniaque, mais on a pu avoir un faible dépôt d'oxalate de calcium, que l'on a transformé en sulfate pour la pesée. Les eaux-mères de l'oxalate, ramenées avec les eaux de lavage, au volume de 3 c. c., ont été additionnées de phosphate de sodium et de 1 c. c. d'ammoniaque : il s'est déposé lentement de petits cristaux que l'on a recueillis après vingt-quatre heures, puis calcinés et pesés. Le produit calciné ainsi obtenu n'était pas formé exclusivement de phosphate de magnésium : après digestion au bain-marie dans l'acide nitrique au 1/10 et évaporation à sec, il y a été retrouvé 0,0020 g. de silice et une trace de calcium, de sorte qu'il ne devait pas contenir tout à fait 0,0001 g. de magnésium. L'analyse n'a

donc permis de doser, en définitive, dans les 4 litres d'eau que :

Silice. . . . .	0,0007 g.
Calcium . . . . .	0,0003 g.
Magnésium. . . . .	0,0001 g.

Quand on récolte l'eau du ciel, il n'y a, pendant longtemps dans l'éprouvette, à cause de l'évaporation entre les chutes météoriques, qu'un volume de liquide compris entre quelques dizaines et quelques centaines de centimètres cubes. Ce volume s'accroît passablement dans les périodes de fortes averses, mais il dépasse rarement 2 à 3 litres, même à la fin d'une année (sur les 8 litres environ qu'il reçoit).

La mise au contact de 4 litres d'eau distillée avec la paroi de l'éprouvette, dès le début de l'expérience dont la durée a été de trois mois, suffit donc largement à démontrer, compte tenu du résultat de l'analyse finale, que ce n'est pas à une dissolution partielle du verre de l'éprouvette qu'il soit permis d'attribuer les proportions de magnésium mises en évidence dans l'eau de pluie.

\*  
\* \*

Il semble donc bien, d'après l'ensemble des expériences que je viens d'exposer, que l'eau de pluie récoltée à Grignon renferme des quantités de magnésium en dissolution qui sont d'une autre origine que celle des poussières terrestres du voisinage apportées par le vent.

# ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.*)

Séance du 1<sup>er</sup> avril 1943.

## COMMUNICATIONS (*SUITE ET FIN*)

### ÉTUDES SUR LE POUVOIR ANTISULFAMIDE

#### VIII. — POUVOIR ANTISULFAMIDE DE DIFFÉRENTS ORGANES [COBAYES] (\*) CONCLUSIONS TIRÉES DE CES DONNÉES

par F. NITTI, J. TABONE, H. MOUSSET et M. SENECAI.

L'hydrolyse enzymatique de différents organes chez le cobaye libère des quantités d'antisulfamide extrêmement différentes (1).

C'est ainsi que si on s'adresse à l'hydrolyse papaïnique on trouve pour les peptones provenant du muscle et du foie un pouvoir anti-sulfamide sensiblement égal (2.000  $\gamma$  pour 1 g. d'N total) ; celui des peptones du rein est deux fois moindre et celui des peptones du sérum dix fois plus petit.

En ce qui concerne le muscle, nous devons signaler quelques points assez particuliers. La partie protéinique du muscle est essentiellement constituée par de la myosine et du myogène. L'hydrolyse enzymatique du muscle total par la papaïne, la trypsine ou la pepsine, libère dans les mêmes conditions des quantités d'antisulfamides beaucoup plus élevées que si l'on procède sur les protéides isolés tels que la myosine et le myogène, et cela pour des hydrolysats comparables en résidu sec et en azote total et assez voisins en azote aminé.

On pourrait en déduire que d'autres éléments musculaires sont particulièrement riches en antisulfamides et que la myosine et le myogène ne sont pas les sources uniques d'antisulfamides dans le muscle. Les

(\*) Il s'agit du pouvoir antisulfamide de la fraction de l'organe qui est passée en solution du fait de l'action des enzymes.

(1) Les dosages sont pratiqués sur le *Proteus vulgaris*, cultivé en milieu synthétique par comparaison avec des solutions titrées de sulfamide et d'acide *p*-aminobenzoïque.



TABLEAU.

NUMÉRO de l'expérience		POUR 1 GR. N TOTAL (Kjeldahl)		P. ANTI-(MYOSINE) P. ANTI-(MUSCLE)
		N aminé (gr.) (Van Slyke)	Pouvoir antisulfamide	
1. . . . .	Muscle (cobaye) + papaïne.	0,200	2.000	2,5
	Myosine (cobaye) + papaïne.	0,250	800.	
2 a) . . .	Muscle (lapin) + pepsine.	0,321	1.549	3,3
	Myosine (lapin) + pepsine.	0,203	398	
b) . . .	Muscle (lapin) + pepsine + suc pancréatique activé.	0,498	4.338	2,3
	Myosine (lapin) + pepsine + suc pancréatique activé.	0,530	1.838	

derniers essais de Auhagen (2) montrent que le dérivé glutamique de l'acide *p*-aminobenzoïque est de beaucoup plus actif que l'acide lui-même et il n'est pas impossible que dans les peptones l'antisulfamide soit représenté par un dérivé de ce type. Les peptones de myosine et les peptones de muscle total se comportent d'une façon différente vis-à-vis de l'hydrolyse acide ou alcaline. Après hydrolyse acide poussée, le pouvoir résiduel antisulfamide du muscle est deux fois plus faible qu'après hydrolyse alcaline. Inversement, après hydrolyse acide de la myosine, le pouvoir résiduel est plus élevé qu'après hydrolyse alcaline. Ce comportement différent correspond peut-être à des structures différentes d'antisulfamides.

Nous avons vu que le sérum sanguin ne contient que des traces minimes d'antisulfamides et qu'après hydrolyse enzymatique des quantités appréciables peuvent être mises en évidence. Par contre, après hydrolyse acide poussée (trois heures à 120° en tube scellé HCl 5 N) on fait disparaître presque complètement ce pouvoir. Cette constatation est intéressante, car il est utile de connaître des hydrolysats protéiques dépourvus de pouvoir antisulfamide pour différencier des phénomènes qui souvent s'intriquent, et notamment le pouvoir antisulfamide propre et l'action favorisante de ces hydrolysats sur la multiplication microbienne. D'autre part, les hydrolysats protéiques non antisulfamides peuvent être utilisés comme source azotée complexe sur des germes assez exigeants, tels que le staphylocoque. Cela permet l'étude facile du pouvoir bactériostatique des sulfamides sur ces microbes, étude qui n'est pas réalisable dans les peptones de muscle.

(2) E. AUHAGEN, *Hoppe-Seyler's Zeitschr.*, 1943, 277, 197.

## DIGESTION PAPAÏNIQUE DES VIANDES CUITES APPLICATION A LA PRÉPARATION D'UN NOUVEAU MILIEU DE CULTURE

par CLAUDE BELIN.

A la suite de diverses publications concernant l'obtention de milieux de culture à base de digestion papaïnique de viandes impropres à la consommation humaine (1, 2, 3, 4, 5), nous avons mis au point un milieu extrêmement simple à préparer, nécessitant cinq fois moins de papaïne que les milieux précédemment décrits et qui nous a donné d'excellents résultats.

Les milieux proposés dans ces publications sont uniquement composés de digestion papaïnique, alors que le bouillon Martin généralement utilisé précédemment est fait de digestion pepsique et de macération de viande à parties égales et que le bouillon de viande classique est à base de macération additionnée d'une certaine quantité de produits de digestion (peptones).

Pensant qu'il était peut-être regrettable d'abandonner dans les bouillons la partie macération, nous avons cherché à revenir à la solution classique et additionné nos macérations de produits de digestion papaïnique.

Nous avons recherché une publication ancienne de Münk (6) concernant les peptones papaïniques d'Antweiler. De cette publication nous avons pu retenir que les digestions étaient obtenues par l'action du suc de *Carica papaya* sur de la viande finement broyée cuite avec beaucoup d'eau et lavée. Or c'est ainsi que se présente, dans la fabrication du bouillon classique la viande, après macération, ébullition et expression. C'est donc ce résidu que nous avons utilisé pour nos digestions.

Nous avons adopté les proportions habituellement indiquées de 225 g. de viande pour 1 litre d'eau et 2 g. de papaïne (7), qui nous ont donné d'ailleurs les meilleurs résultats et ceci avec des viandes de veau, bœuf ou cheval indifféremment.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- (1) G. RAMON et G. AMOUREUX, *C. R. Acad. Sci.*, 1940, **211**, 304.
- (2) G. RAMON, G. AMOUREUX et J. POCHON, *C. R. Acad. Sci.*, 1941, **213**, 836.
- (3) G. RAMON, G. AMOUREUX et J. POCHON, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1502.
- (4) G. RAMON, G. AMOUREUX et J. POCHON, *Rev. Immunol.*, 1942, **7**, 1.
- (5) G. RAMON, G. AMOUREUX, P. MERCIER et J. POCHON, *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 329.
- (6) I. MÜNK, *Therap. Monatssch. Berl.*, 1888, **2**, 276.
- (7) Papaïne titre 200. Les papaïnes titre 100 et même 50 bien que solubilisant des quantités moindres de viande et produisant des quantités moindres d'azote aminé nous ont donné, dans les conditions exposées ci-dessous, des résultats assez satisfaisants.

TEMPÉRATURE ET TEMPS		AZOTE aminé en grammes p. 1.000	VIANDE solubilisée p. 100	VALEUR comme peptone
Laboratoire	1 jour. . . . .	0,42	40	Nulle.
	2 jours . . . . .	0,84		
	3 jours et plus . . . . .	0,98		
35° à 45°	1 jour . . . . .	2,10	85	Médiocre.
	2 jours . . . . .	4,20		
	3 jours . . . . .	4,90		
	4 jours et plus . . . . .	5,32		
54-55° : 24 heures . . . . .		0,98	72	Excellente.
65-70° : 3 heures et plus . . . . .		0,78	57	Mauvaise.
Élévation du mélange à l'ébullition ou de 47 à 80° en une heure. . . . .		0,18	2	Nulle.
		0,28		

En aucun cas il n'y a de précipité dans le liquide de digestion avec l'acide azotique où le sulfate d'ammonium à saturation. Le stade albumineux est toujours dépassé.

De 30 à 50° d'abondants développements microbiens envahissent le milieu et élèvent rapidement le titre d'azote aminé.

Au fur et à mesure que la température de digestion s'élève, la durée d'activité du ferment diminue ; mais alors qu'elle est épuisée en trois heures à 65° (8), nous avons pu constater qu'elle était encore sensible après vingt heures à 54-55°.

L'élévation du mélange à l'ébullition (9) ou de 47° à 80° en une heure ne donne évidemment aucun résultat sur les viandes cuites. Les digestions explosives (10, 11) obtenues par ces procédés sur les viandes crues donnent un bon milieu de culture mais ne peuvent être utilisées comme peptones.

Le procédé très simple auquel nous nous sommes arrêté est le suivant : on dispose dans un pot émaillé la viande, l'eau et la papaïne dans les proportions indiquées. On maintient la température au bain-marie à 54-55° pendant vingt-quatre heures en agitant de temps à autre. On filtre alors grossièrement le liquide de digestion que l'on répartit en flacons et que l'on stérilise à 115° pendant un quart d'heure.

Dans ces conditions, il est solubilisé 125 à 150 g. de viande par litre de digestion. Cette solution de peptone papaïnique, ou plus exactement de produits de protéolyse papaïnique, est quarante fois plus économique et donne de meilleurs résultats que les peptones bactériologiques du

(8) A. GORIS et A. LIOT, *Pharmacie galénique*, 2, 1217.

(9) S. SUZUKI, *J. Jap. Soc. vet. Sci.*, 1922, 1, n° 2, in *Bull. Inst. Past.*, 1923, 21, 241.

(10) G. DELEZENNE, H. MOUTON et E. POZERSKI, *C. R. Soc. Biol.*, 1906, 60, 309.

(11) E. POZERSKI, ces *Annales*, 1909, 23, 205 et 231.



commerce actuellement rares et chères. Elle est ajoutée au fur et à mesure des besoins dans la fabrication du bouillon de viande classique en remplacement des peptones à raison de 250 c. c. pour 1 litre de macération.

On obtient ainsi un milieu de culture très favorable au développement des germes délicats et supérieur à ce titre aux meilleurs bouillons de viande peptonés habituels, même additionnés de produits spéciaux (sérum, glucose, etc...).

La toxine tétanique obtenue sur ce milieu après addition des produits habituels tue le cobaye à une dilution plus élevée que la toxine habituellement obtenue avec la même souche.

*(Institut Bactériologique de Tours.)*

## RECHERCHES IMMUNOCHIMIQUES SUR LE VIBRION CHOLÉRIQUE

### II. — SUR LES CONSTITUANTS DE LA TOXINE CHOLÉRIQUE

par JEAN GALLUT et PIERRE GRABAR.

Les relations de l'antigène glucido-lipidique (g. l.) du vibrion cholérique avec les immunosérums de lapin qui ont fait l'objet d'une note précédente (1) nous ont amenés à étudier ici la structure antigénique de la toxine cholérique. Celle-ci, nous l'avons vu (2), contient elle-même un complexe g. l. en même temps que des substances protidiques. Nous nous sommes proposés, en appliquant la même méthode quantitative, de répondre aux questions suivantes :

1° La toxine comprend-elle plusieurs antigènes ?

2° Le complexe g. l. de la toxine est-il différent du g. l. extrait du vibrion ?

En ce qui concerne le premier point, les faits suivants sont à noter : un sérum antitoxine épuisé par du g. l. ne précipite plus par la toxine. Il semble donc que la toxine ne possède pas d'autre antigène que le g. l.

Pour vérifier cette observation d'une manière plus sûre, nous avons fait appel à la méthode quantitative. Nous avons d'abord éliminé de la toxine l'antigène g. l. en saturant la toxine par un sérum anti-g. l. ; puis, nous lui avons ajouté du g. l. dans les mêmes proportions. Un sérum antitoxine dosé ensuite par ce mélange, d'une part, et par du g. l., d'autre part, nous a fourni deux courbes pratiquement identiques, prouvant que ce sérum ne contient pas d'autres anticorps que les anticorps anti-g. l. (voir fig. 1, courbes A et B).

Pour juger du deuxième point, il importe de tenir compte de l'insta-

(1) Note précédente, *ces Annales*, 250.

(2) J. GALLUT, *ces Annales*, 1943, 69, 123.

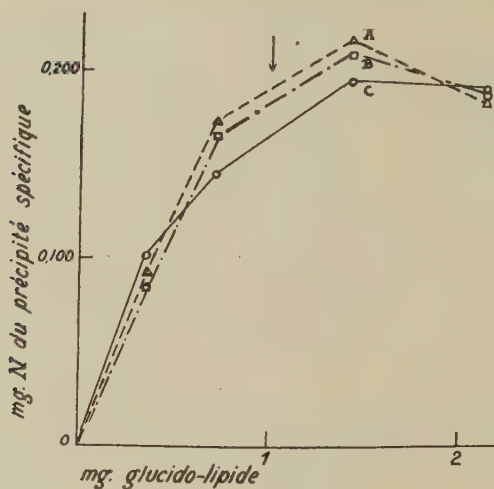


FIG. 1. — Courbes de précipitation obtenues avec un sérum antitoxine. Les flèches indiquent l'équivalence.

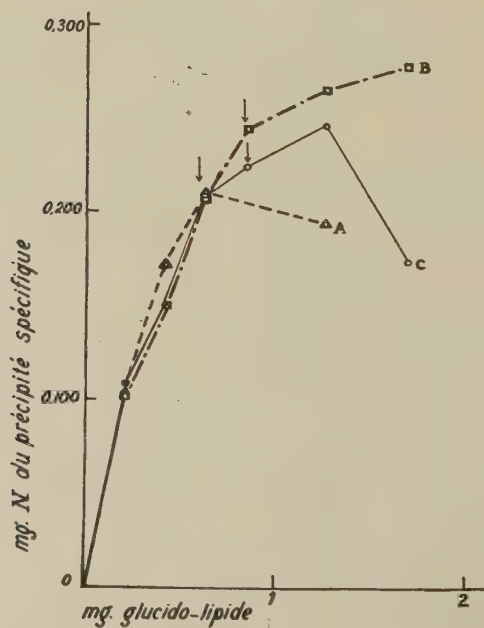


FIG. 2. — Courbes de précipitation obtenues avec un sérum anti-g. l.

bilité particulière de la toxine cholérique. En effet, la méthode quantitative montre qu'une toxine fraîche donne des résultats (courbe C, fig. 2) presque identiques à ceux obtenus avec le g. l. extrait de la toxine (courbe B, fig. 2), et légèrement supérieurs à ceux du g. l. bactérien (courbe A, fig. 2). Par contre, une toxine conservée depuis longtemps fournit une courbe de précipitation plus basse (courbe C, fig. 1).

D'autre part, lorsqu'on compare les courbes de précipitation par le g. l. (A) aux courbes de précipitation par la toxine (C) et par le g. l. de la toxine (courbe B, fig. 2), on constate que les deux dernières sont plus élevées. Le sérum employé (anti-g. l.) ne pouvant contenir que des anticorps anti-g. l., puisque le lapin n'a été injecté que par cette substance, on est amené à expliquer ces différences par une composition différente du g. l. de la toxine. Celui-ci donne en effet plus difficilement que le g. l. bactérien des composés solubles en présence d'un excès d'antigène.

Nous avons donc tout lieu de penser qu'au début de son élaboration la toxine contient un antigène g. l. complexe, qui est ensuite clivé pour donner un g. l. plus simple (comme celui extrait des vibrions eux-mêmes) et une substance qui ne précipite pas avec les immun-sérums.

Nous espérons pouvoir confirmer cette hypothèse en faisant appel à une autre méthode (l'ultrafiltration).

*(Laboratoires des Instituts Pasteur coloniaux  
et Service de Chimie microbienne de l'Institut Pasteur.)*

## Séance du 6 mai 1943.

Présidence de M. JACQUES TRÉFOUËL.

### COMMUNICATIONS

#### **APPLICATION DE LA MÉTHODE DE WARBURG A L'ÉTUDE DE L'ACTION ESTÉRASIQUE DU VENIN DE COBRA**

par F. BOVET et D. BOVET.

Depuis les travaux de Delezenne et Fourneau l'on sait que sous l'influence du venin de cobra la lécithine est hydrolysée et libère une substance hémolytique, la « lysocithine » ou anhydride de l'éther monopalmito-phosphoglycérique de la choline. Ces recherches qui



représentaient l'aboutissement des travaux de Ludecke, de Neuberg et Rosenberg, de Dungern et Coca et de Kyes, permettaient d'assimiler

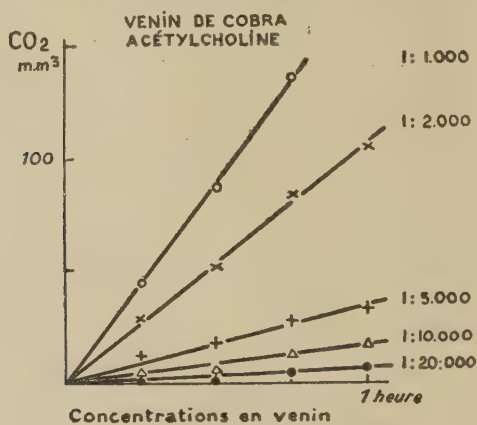


FIG. 1.

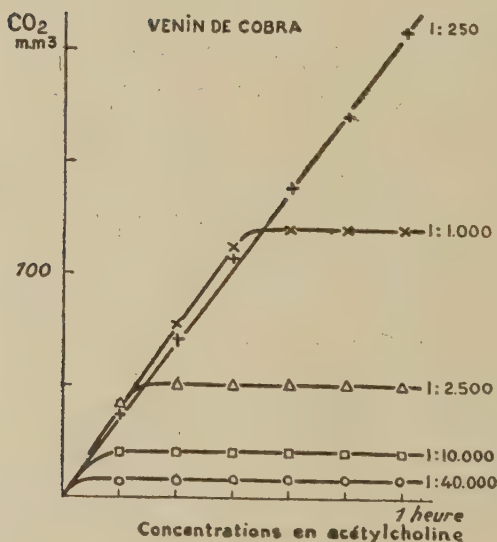


FIG. 2.

à une action fermentaire certains au moins des effets toxiques des venins.

Les lois de l'action fermentaire exercée par les venins n'ont pas été précisées jusqu'ici. En nous proposant d'en aborder l'étude nous nous sommes dès le début heurtés à une difficulté dont l'explication

ne nous apparaît pas encore : comme l'avaient déjà noté certains auteurs (Levene et Rolf), nous avons en effet constaté que le venin de cobra, très actif sur le jaune d'œuf, n'hydrolyse que très lentement les lécithines pures préparées à partir du jaune d'œuf. Ne désirant pas aborder d'emblée l'étude quantitative des effets diastasiques du ferment sur un substrat aussi complexe que le jaune d'œuf, nous avons cherché l'activité hydrolysante du venin vis-à-vis d'autres esters de la glycérine ou de la choline et constaté que l'action estérasique exercée par le venin de cobra, qui ne paraît pas aussi spécifique qu'on l'a généralement admis, s'étend à l'acétylcholine et à la triacétine par exemple. Nous rapportons dans cette note les résultats ayant trait à l'action du venin sur l'acétylcholine.

Jusqu'ici les expérimentateurs ont utilisé comme critère la formation

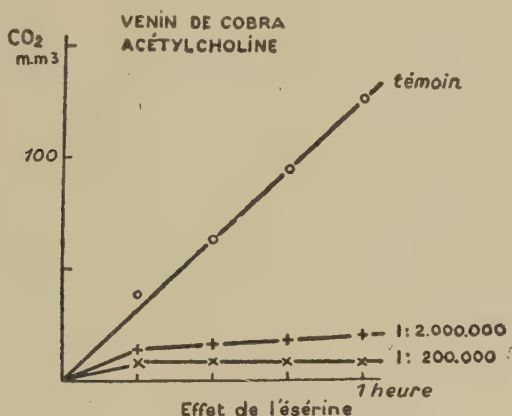


FIG. 3.

de dérivés hémolytiques à partir de la lécithine ; certains auteurs ont eu recours à la méthode de titration continue en présence d'un indicateur coloré (Belfanti, Francioli), d'autres aux mesures tensiométriques (Hughes). Nous nous sommes demandé s'il n'était pas possible de suivre la réaction par une technique plus générale et plus précise et avons utilisé dans ce but la méthode manométrique de Warburg, en nous plaçant dans des conditions voisines de celles utilisées par Ammon dans l'étude de la cholinestérase sanguine.

Le volume total des liquides mis en réaction est de 2 c. c., soit 1,5 c. c. de substrat dans le récipient central et 0,5 c. c. d'une solution de venin dans le diverticule latéral (1).

Dans ces conditions, les concentrations différentes de venin se traduisent par des droites très régulières, l'effet étant encore sensible à une concentration en venin de 1/50.000 (fig. 1).

L'étude de la concentration en substrat montre au contraire que

(1) Le liquide employé, dit Ringer 20, se compose ainsi : NaCl, 100 c. c. à 0,9 p. 100 ; ClK, 2 c. c. à 1,2 g. p. 100 ; CaCl, 2 c. c. à 1,76 g. p. 100 ; NaHCO<sub>3</sub>, 20 c. c. à 1,26 g. p. 100.

dans des limites très étendues la vitesse de réaction est indépendante de la concentration du milieu en acétylcholine. Dans l'expérience figurée sur la courbe 2, la vitesse d'hydrolyse à l'origine est la même pour des concentrations d'acétylcholine variant entre 1/250 et 1/2.500. La réaction ne présente pas de temps de latence. Une autre particularité de l'action fermentaire du venin sur l'acétylcholine, c'est l'indépendance relative de la vitesse de réaction vis-à-vis de la température. La plupart de nos essais ont été effectués à une température de 20° ; à la température de 37°, la vitesse d'hydrolyse est sensiblement la même.

D'après certains auteurs l'ion Ca joue un rôle favorisant dans l'action des venins sur la lécithine. Nous avons utilisé tour à tour un liquide de Ringer sans calcium ou sans potassium ou encore un liquide sans calcium et additionné de citrate de soude sans que la vitesse d'hydrolyse de l'acétylcholine par le venin soit modifiée.

Les facteurs connus pour altérer les propriétés toxiques du venin font également disparaître son action cholinestérasique. Ni le venin préalablement additionné de  $\text{MnO}_4\text{K}$  (1/5.000), ni le venin préalablement chauffé n'hydrolysent l'acétylcholine.

La question des inhibiteurs de l'action diastasique des venins ne paraît pas avoir été étudiée jusqu'à présent malgré tout l'intérêt pratique qui s'y rattache. Dans les conditions expérimentales décrites il est très facile de constater que l'ésérine manifeste son action anticholinestérasique classique. A la concentration de 1/2.000.000 l'inhibition des effets diastatiques des venins est encore presque totale. Le bleu de méthylène agit également mais à des concentrations plus élevées [1/1.000] (fig. 3).

Les expériences que nous avons faites permettent de conclure à la pluralité des estérases contenues dans le venin. En faveur de cette hypothèse plaident, d'une part le fait que l'action cholinestérasique du venin s'exerce à des concentrations environ cent fois plus élevées que son effet estérasique sur le jaune d'œuf ou sur la triacétine, sur lesquels des dilutions de 1/1.000.000 sont sans effet, et le fait que l'ésérine inhibe l'action du venin sur l'acétylcholine tandis qu'elle ne s'oppose pas à l'hydrolyse diastasique de la triacétine et de la lécithine.

Nous avons pu vérifier l'effet cholinestérasique du venin de cobra en réalisant un titrage biologique de l'acétylcholine sur la pression du chien chloralosé. Un chien chloralosé et dont on enregistre la pression artérielle reçoit par voie intraveineuse une dose témoin de 2  $\gamma$  de chlorhydrate d'acétylcholine par kilogramme. Si l'acétylcholine est laissée à l'étuve à 37° en présence d'une concentration de 1/1.000 de venin, l'on constate la rapide disparition des propriétés vaso-motrices du mélange, disparition qui témoigne de l'hydrolyse progressive de l'acétylcholine. Au bout de six minutes de contact l'effet hypotenseur de la solution est diminué : il a disparu au bout de trente minutes. La même expérience avec des dilutions de 1/10.000 n'a donné aucun résultat.

(Institut Pasteur, Laboratoire de Chimie Thérapeutique.)



# IDENTIFICATION DE L'ACÉTYL-MÉTHYL-CARBINOL DANS LES MILIEUX DE CULTURE PAR L'OSAZONE CORRESPONDANTE ET SENSIBILISATION DE LA MÉTHODE DE LEMOIGNE

par R. PIROT, M. BOURGAIN et J. DUFAU-CASANABE.

La recherche de l'acétyl-méthyl-carbinol (A.M.C.) pratiquée dans le but d'asseoir le diagnostic différentiel d'un certain nombre de germes, et tout particulièrement celui des *Escherichia*, *Aerobacter* et *Klebsiella*, nous a conduits à améliorer la méthode de Lemoigne (1); celle-ci repose sur la transformation de l'A.M.C. en diméthylglyoxime que l'on caractérise par le précipité rouge qu'elle fournit avec les sels de nickel.

En effet, cette méthode, malgré sa haute sensibilité alléguée (1/1.000.000), nous a fourni des résultats négatifs avec des germes certainement producteurs d'A.M.C. Nous l'avons « sensibilisée » de la façon suivante : on sait que dans la méthode de Lemoigne, on ajoute à 3 ou 4 c. c. de la solution ammoniacale de diméthylglyoxime formée, V gouttes d'une solution de chlorure de nickel à 10 p. 100 ; on obtient ainsi une solution dont l'intense coloration *bleue* masque, par la suite, le précipité *rouge* de nickeldiméthylglyoxime. Au contraire, en utilisant II à III gouttes d'une solution plus diluée d'un sel de nickel (à 0,05 g. p. 100 d'ion Ni), on obtient une solution pratiquement incolore, et la moindre coloration rose produite est alors décelable, coloration du reste proportionnelle à la teneur du milieu en A.M.C.

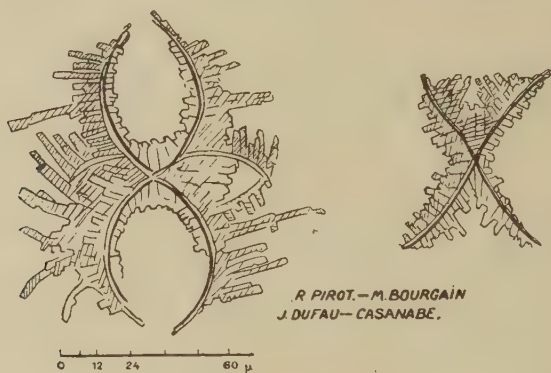
D'autre part, nous avons constaté que les solutions de sels de cuivre à 0,05 g. p. 100 d'ion Cu fournissent également une coloration rose avec une sensibilité identique ; mais l'intensité de la coloration n'est pas proportionnelle à la teneur du milieu en diméthylglyoxime, et cette modification est sans intérêt. Il n'en va pas de même avec les *solutions de sels ferreux* qui, à la dose de 0,05 g. p. 100 d'ion Fe divalent, donnent une coloration qui va du jaune orangé ou rouge, selon la teneur du milieu en diméthylglyoxime. *La sensibilité est ici environ six fois plus forte qu'avec les sels de nickel.* C'est la variante que nous avons retenue et dont nous nous servons habituellement.

Mais cette méthode, malgré sa spécificité et sa haute sensibilité (sur-tout avec les solutions de sels de fer), a encore l'inconvénient, dans la pratique bactériologique, de nécessiter une distillation préalable de la culture, après l'oxydation de l'A.M.C. en diacétyl, en présence de chlorure ferrique ; elle est longue, et ne se prête guère à des recherches en série. Aussi l'avons-nous remplacée, dans la pratique courante, par la mise en évidence de l'osazone correspondante. L'A.M.C. en effet, possédant une fonction alcool secondaire voisine d'une fonction cétone, réagit sur la phénylhydrazine avec formation d'une osazone parfaitement cristallisée que Grimberty (2) avait déjà signalée en 1901.

(1) M. LEMOIGNE, *C. R. Acad. Sci.*, 1920, **171**, 131.

(2) GRIMBERT, *C. R. Acad. Sci.*, 1901, **132**, 706 ; *Bull. Soc. Chim.*, 1901, **25**, 415.

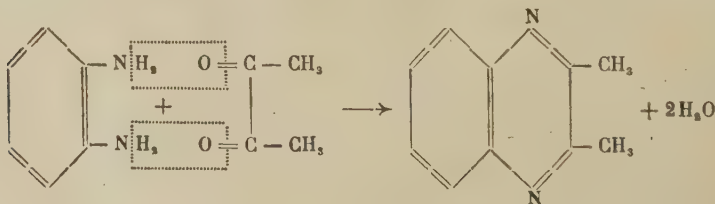
Pour obtenir cette osazone, il suffit de porter pendant vingt minutes à une demi-heure, au bain-marie, un mélange à volumes égaux de la culture microbienne et du réactif à la phénylhydrazine (1 c. c. ou même moins de chaque suffit pour la réaction). L'examen microscopique direct, entre lame et lamelle, montre des cristaux très caractéristiques (fig. 1), de longueur assez variable, entre 50 et 120  $\mu$  ; au bout de deux minutes au bain-marie, on note déjà la présence de petits cristaux très réguliers, en forme de croix de Saint-André ou de X ; si le contact est maintenu au bain-marie, pendant une demi-heure, la forme cristalline initiale se développe et rappelle deux feuilles de fougère croisées, cette disposition initiale pouvant se modifier et se compléter en 8 de chiffre. La distillation de la culture, après oxydation en présence de  $\text{Cl}_2\text{Fe}$  est inutile dans cette réaction, l'A.M.C. et le diacétyle donnant la même osazone. Il se peut qu'à côté de l'osazone spécifique



on rencontre la glucosazone, lorsque le glucose du milieu n'a pas été entièrement métabolisé par le germe, mais il n'y a pas de confusion possible entre ces deux formes cristallines essentiellement différentes ; de plus, l'osazone de l'A.M.C. précipite au bain-marie, alors que celle du glucose ne précipite que par refroidissement.

Cette méthode est d'une très grande sensibilité ; elle nous a donné des résultats positifs là où la réaction de Lemoigne classique était négative. De plus, son extrême simplicité en fait la méthode de choix pour la recherche en série et la pratique bactériologique courante. Elle est en parfaite concordance avec les résultats obtenus par la méthode de Lemoigne sensibilisée.

Enfin, nous avons également utilisé une réaction de condensation du diacétyle avec l'ortho-phénylène diamine.



La technique est la suivante : à 1 c. c. du distillat obtenu comme dans la méthode de Lemoigne, on ajoute quelques cristaux d'ortho-phénylène diamine et 1 c. c. de  $\text{SO}_4\text{H}_2$ . Il se produit une coloration jaune citron. L'inconvénient ici, comme pour la réaction de Lemoigne, est la nécessité d'une distillation préalable.

*En conclusion* : l'acétyl-méthyl-carbinol peut être recherché par trois méthodes de très haute sensibilité :

1° Méthode de Lemoigne « sensibilisée », de préférence par l'emploi d'une solution de sel ferreux à 0,05 g. d'ion Fe divalent, qui donne des résultats supérieurs à ceux fournis par les solutions de sel de nickel ou de sel de cuivre, à même proportion d'ion métal.

2° Méthode à l'osazone, très simple, élégante et fort pratique. La forme cristalline de l'osazone obtenue est caractéristique et ne saurait donner lieu à confusion, même dans les cas de mélange avec d'autres osazones.

3° Méthode à l'ortho-phénylène diamine d'une valeur sensiblement égale à celle de Lemoigne « sensibilisée ».

*(Laboratoire de Bactériologie de la Marine, à Toulon.)*

**M. Lemoigne** : La caractérisation de l'acétylméthylcarbinol est très utile en pratique bactériologique et toute modification qui simplifie la technique, sans amoindrir la spécificité, est intéressante. Mais il ne faut pas oublier que l'acétylméthylcarbinol paraît être un produit intermédiaire très fréquent, si ce n'est absolument général, du métabolisme glucidique chez les êtres vivants. Il s'agit donc, pour un test bactériologique, non pas de déterminer s'il y a ou non de l'acétylméthylcarbinol, mais plutôt de rechercher s'il y en a une certaine quantité décelable par la réaction choisie. Les qualités essentielles de cette réaction sont donc la spécificité et la fixité de la sensibilité beaucoup plus que cette sensibilité elle-même.

**M. E. Perdigon** : En 1938, Prill et Hammer (\*) ont décrit une micro-méthode colorimétrique pour le dosage de l'acétylméthylcarbinol basée sur la formation d'un « diméthylloximate » ammonio-ferreux, coloré en rose rouge et moins soluble que la nickel-diméthylglyoxime. Cette microméthode permet, d'après les auteurs, de doser de 0,010 mg. à 0,150 mg. d'acétylméthylcarbinol dans la prise d'essai.

## LA PRODUCTION D'ACÉTYL-MÉTHYL-CARBINOL DANS LES MILIEUX DE CULTURE IMPORTANCE DES FACTEURS D'OXYDO-RÉDUCTION

par R. PIROT, M. BOURGAIN et J. DUFAU-CASANABE.

La réaction de Voges-Proskauer, qui a pour but la mise en évidence de la production d'acétyl-méthyl-carbinol (A.M.C.) aux dépens du glucose par fermentation déviée d'origine microbienne, fait partie des

(\*) E. A. PRILL et B. W. HAMMER, *Iowa St. Coll. Journ. of Sc.*, 1938, 42, 385.



cinq méthodes d'examen prévues dans les « Standard methods of water analysis » (1).

Voici les cinq procédés envisagés :

- a) Procédé dit « standard method » ;
- b) Procédé à l'eau oxygénée ;
- c) Procédé par agitation ;
- d) Procédé à la solution concentrée de soude ;
- e) Procédé à la solution faible de caséine.

Nous reprochons à ces méthodes leur inconstance ; l'action du diacétyl sur les peptones varie selon la nature et la qualité de celles-ci. D'autres méthodes sont encore moins certaines. Nous avons proposé celle de l'osazone (Oz) et celle de Lemoigne modifiée (L.M.n.), qui nous paraissent mieux définies et d'une extrême sensibilité (2).

L'emploi de la méthode de O'Meara, qui utilise pour la réaction de V.P. un milieu synthétique type Koser, avec adjonction de glucose et d'acide fumarique, et qui caractérise la présence de l'A.M.C. par l'action de la créatine, nous a conduits à étudier l'importance des facteurs d'oxydo-réduction dans la production de l'A.M.C.

Le procédé de O'Meara a comme gros inconvénient d'exiger 0,20 g. de créatine par réaction ; la rareté et le prix de revient de ce produit interdisent actuellement l'emploi courant de cette réaction, par ailleurs très sensible.

L'acide fumarique ( $\text{COOH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ ), acide non saturé, joue, comme nous l'avons constaté, le rôle d'un puissant facteur d'oxydo-réduction dans le procédé de O'Meara ; nous avons cherché à substituer à cette action celle d'un produit plus courant.

Nos expériences ont été conduites sur deux souches, l'une *Aerobacter aerogenes* Le Meur, ne donnant que de faibles quantités d'A.M.C., l'autre *Aerobacter cloacae* 15<sup>2</sup>, qui en donne de très fortes proportions. Les méthodes de détection ont été celles que nous avons proposées (Oz. et L.M.n.), et nous avons pris comme méthode témoin celle de Lemoigne type. Pour éliminer toute influence de production due au seul acide fumarique, nous avons à chaque fois constitué des témoins avec une souche d'*Escherichia* connue comme ne donnant aucune trace d'A.M.C.

Le milieu de culture utilisé a été celui indiqué dans le procédé de O'Meara (3). Ce milieu a été employé avec ou sans acide fumarique. La répartition était faite non en fioles d'Erlenmeyer, mais en tubes à essais, à raison de 10 c. c. de milieu par tube, chaque tube du premier lot renfermant ainsi 7 cg. d'acide fumarique. Le pH a été ajusté à  $\text{pH} = 7,5$ .

Chacune de nos deux souches a étéensemencée sur deux lots de milieu type « O'Meara », l'un avec, et l'autre sans acide fumarique. L'A.M.C. a été systématiquement recherché jusqu'au quinzième jour.

**Résultats :** ils sont exposés dans les graphiques ci-après :

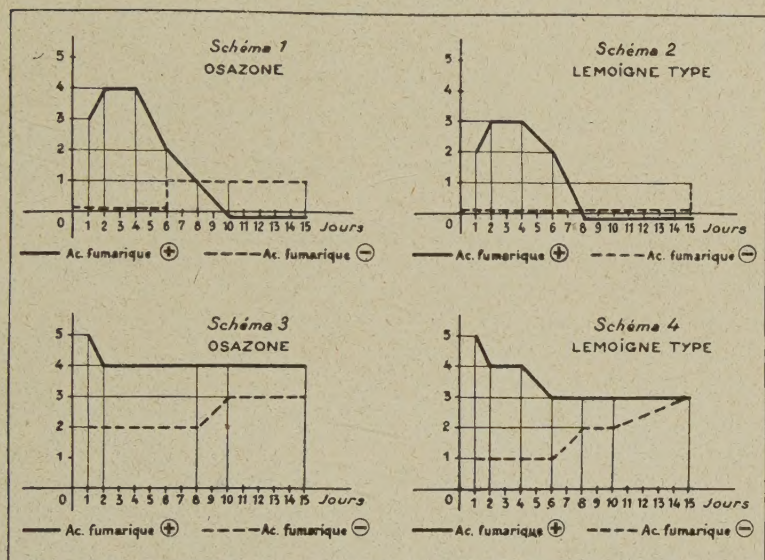
- (1) R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et CHU, *Rev. Hyg.*, 1931, 53, 241.  
 (2) R. PIROT, M. BOURGAIN et J. DUFAY-CASANABE, ces *Annales*, 1943, 69.  
 (3)
- |                                  |     |                            |       |
|----------------------------------|-----|----------------------------|-------|
| NaCl . . . . .                   | 5   | Acide fumarique . . . . .  | 7     |
| Phosphate bipotassique . . . . . | 1   | Glucose . . . . .          | 5     |
| Phosphate biammonique . . . . .  | 1   | Citrate de soude . . . . . | 2,77  |
| Sulfate de magnésium . . . . .   | 0,2 | Eau bidistillée . . . . .  | 1.000 |

1° Faible producteur d'A.M.C.  
(Souche *Aerobacter aerogenes* Le Meur).

On retiendra à la lecture des graphiques 1 et 2 :

a) La production progressive, mais lente, d'A.M.C. dans le milieu synthétique privé d'acide fumarique, et l'inutilité d'en pratiquer la recherche avant six jours d'étuve à 37° par le procédé de l'osazone, ou avant le quinzième jour d'incubation, par le Lemoigne type.

b) Le rôle important joué par l'acide fumarique dans le processus



Interprétation de l'échelle des ordonnées : 5, précipité rouge à chaud avec la réaction de Lemoigne type, 50 à 80 cristaux d'osazone par champ du microscope (obj. 2, ocul. 4); 4, teinte rouge avec précipité rouge par refroidissement, 30 à 50 cristaux d'osazone par champ du microscope; 3, coloration rouge franche seulement, sans précipité, 20 à 30 cristaux d'osazone par champ du microscope; 2, coloration rouge seulement après refroidissement, 5 à 20 cristaux d'osazone par champ du microscope; 1, coloration rose légère 1 à 5 cristaux d'osazone par champ du microscope.

d'attaque du glucose, permettant l'appréciation rapide de la production d'A.M.C. (dès la vingt-quatrième heure d'étuve à 37°), avec un maximum quantitatif du deuxième au quatrième jour.

c) La sensibilité du procédé à l'osazone, plus grande que celle du Lemoigne type.

La réaction de Lemoigne dite « sensibilisée » que nous avons précédemment proposée nous a donné des résultats analogues à ceux obtenus par le procédé à l'osazone et s'est montrée positive avec la même souche Le Meur, dès le sixième jour de culture, sans acide fumarique.



## 2° Fort producteur d'A.M.C. (Souche A. cloacae 15°).

On constate ici (graphiques 3-4) :

a) Qu'il y a formation progressive d'A.M.C. dans le milieu sans acide fumarique.

b) Qu'en présence de l'acide fumarique, on obtient après vingt-quatre heures de culture un maximum d'A.M.C., avec diminution progressive, pour finir en palier.

L'acide fumarique est un produit peu courant, mais les résultats qu'il fournit sont intéressants ; nous avons cherché à le remplacer par d'autres facteurs d'oxydo-réduction ; nous avons constaté :

1° Que les quinones, et en particulier l'hydroquinone, ont une action stérilisante.

2° Que l'acide ascorbique, à la dose de 1 à 5 mg. pour 10 c. c. de milieu synthétique ne favorise nullement la production d'A.M.C.

3° Que l'adjonction d'adrénaline a une action favorisante, à la dose de 1 mmg. pour 10 c. c. de milieu, mais que cette action demeure faible, comme l'indique le tableau suivant (détection par le procédé de l'osazone après quarante-huit heures environ de culture).

APRÈS 48 HEURES. SOUCHE LE MEUR			
avec acide fumarique	sans acide fumarique	avec vitamine C	avec adrénaline
+++	0	0	+

Nous n'avons pas utilisé la vitamine E, du fait de sa rareté sur le marché, et de son prix de revient élevé.

A défaut d'acide fumarique, on peut donc utiliser l'adrénaline pour la production d'A.M.C. que l'on mettra en évidence dès le début du troisième jour.

Les milieux synthétiques type Koser sont des milieux pauvres, dans lesquels les germes tirent leur carbone du citrate de soude et du glucose surajouté. Cependant la culture est en général visible dès la seizième heure. Or, en l'absence d'acide fumarique, nous avons vu que par les méthodes les plus sensibles on ne peut déceler la présence d'A.M.C. avant le sixième jour. Comme l'A.M.C. dérive du glucose au cours de la fermentation microbienne, il semble bien, en fin de compte que l'attaque du citrate de soude se produise avant celle du glucose. Nous avons d'ailleurs constaté qu'en milieu peptoné (eau peptonée glucosée à V gouttes d'une solution de glucose à 30 p. 100 par tube), milieu plus riche en carbone, sans acide fumarique, la production d'A.M.C. est plus précoce et gagne deux jours, car on peut le déceler dès la quatre-vingt-seizième heure. L'attaque du glucose est donc, ici encore, postérieure à l'utilisation du carbone de la peptone.

Conclusion : 1° l'acide fumarique, facteur d'oxydo-réduction, permet d'apprécier, au bout de vingt-quatre heures de culture, la production d'acétyl-méthyl-carbinol par un germe type *Aerobacter*, aux dépens du glucose.

2° En l'absence de facteurs d'oxydo-réduction, il y a formation lente et progressive d'acétyl-méthyl-carbinol ; en milieux synthétiques, il convient de ne pratiquer sa recherche qu'entre le sixième et le quinzième jour. En milieux peptonés, cette recherche peut être positive dès le quatrième jour.



3° Les facteurs d'oxydo-réduction, hydroquinone et acide ascorbique, ne peuvent pas remplacer l'acide fumarique ; l'adrénaline a une action favorisante certaine mais faible dans la production d'A.M.C.

4° Les procédés de l'osazone et de Lemoigne « sensibilisé » permettent, du fait de leur sensibilité, d'obtenir un résultat dans des délais raccourcis.

*(Laboratoire de Bactériologie de la Marine, à Toulon.)*

## **SUR L'ÉVOLUTION CHEZ LE LAPIN DES LÉSIONS VACCINALES ALLERGIQUES PENDANT L'INCUBATION DE LA PRIMO-INSERTION VIRULENTE**

par GASTINEL et R. FASQUELLE.

Désirant préciser différents points dans l'étude de l'allergie vaccinale et poursuivre ainsi des recherches commencées il y a bien longtemps, nous avons estimé nécessaire de caractériser le mieux possible l'évolution des réactions allergiques chez le lapin au cours même de sa vaccination. Il importait d'autre part d'effectuer comparativement les investigations avec du virus vivant et avec du virus tué.

Des expériences préalables nous avaient une nouvelle fois montré que pour tuer d'une façon certaine le virus-vaccin, il faut s'entourer de précautions ; et, dans bien des cas, des protocoles ont été faussés par une technique défectueuse, n'aboutissant qu'à l'atténuation du virus et non à sa destruction.

Dans les expériences présentes, nous avons utilisé un dermo-vaccin glyciné, additionné de formol à 40 p. 100, de manière à ce que la proportion de celui-ci se trouve dans l'émulsion vaccinale au taux de 4 p. 1.000.

Le mélange formolé était placé pendant huit jours à l'étuve à 37° ; l'épreuve faite ensuite par voie cutanée et intradermique sur le lapin témoignait de son inactivité totale.

En possession de ce virus tué et conservé ensuite à la glacière, des examens en série furent faits pour apprécier l'état allergique de l'animal au cours de sa vaccination.

Nous citerons en exemple le protocole suivant, en soulignant que toutes les intradermo-réactions ont été faites sur le flanc, en des zones épilées, successivement, à droite pour le vaccin frais, à gauche pour le vaccin tué :

Le lapin 33 reçoit, le 2 novembre 1942, une injection intradermique de dermo-vaccin glyciné vivant et également du matériel vaccinal tué. Une réaction de vaccine typique répond à l'insertion de vaccin vivant ; elle s'ulcère le sixième jour. Aucune réaction ne traduit l'intradermo de vaccin tué.

Au quatrième jour, nouvelle insertion vaccinale, simultanément avec vaccin vivant et tué ; le virus vivant produit une réaction ulcérée à carac-



tère accéléré et atteignant son maximum vers le troisième jour ; le vaccin tué donne un processus inflammatoire érythémateux, légèrement induré, à début précoce et qui subit ultérieurement une fonte caséuse.

La troisième insertion vaccinale a lieu au septième jour de la vaccination, et ne produit avec le vaccin vivant qu'une réaction infiltrée ; avec le vaccin tué, un processus inflammatoire analogue à celui décrit, survenant vite et ayant évolué secondairement vers un petit nodule de caséification.

Le neuvième jour, les injections intradermiques de virus vivant n'ont plus fourni qu'une réaction érythémateuse à début rapide et disparaissant vite, en tous points analogues à celle obtenue par le vaccin tué.

Au onzième et seizième jour, on retrouve l'identité réactionnelle, avec vaccin frais et tué.

Nous pourrions citer de façon exactement superposable d'autres protocoles qui ont permis dans les mêmes délais des constatations analogues. Cependant, la réactivité de la peau de lapin à toute substance irritante rend difficile parfois de juger de la réaction allergique dans toute sa pureté, en raison surtout du fait que, chez cet animal, l'injection intradermique de substances étrangères peut produire un nodule caséux.

En résumé, les faits suivants ressortent de nos investigations : pendant l'incubation d'une primo-vaccination, le vaccin vivant inoculé dans le derme en série jusqu'au quatrième jour produit chez le lapin une réaction évolutive accélérée et ulcéreuse ; à partir de cette date, et au moins pour les animaux revaccinés sur un territoire de voisinage, le vaccin vivant ne détermine plus de lésion ulcéreuse et souvent même n'agit plus que comme antigène sur un terrain déjà sensibilisé produisant une réaction précoce non ulcérée.

Le virus tué, qui ne produit rien chez le lapin neuf, provoque dès le quatrième jour après la primo-inoculation un processus inflammatoire dont l'évolution rappelle le type clinique de la réaction précoce. On retrouve ainsi la date du quatrième jour déjà indiqué par différents auteurs, utilisant d'autres moyens d'investigation, comme moment où s'établit l'immunité [Henseval et Convent ; Plotz (1)].

Les résultats ainsi obtenus sont en tous points comparables à ceux observés jadis par l'un de nous et qui ont été publiés dans la thèse de son élève Mortier (2). L'expérimentation avait été faite sur l'homme et montrait de la même manière l'évolution de l'état allergique au cours de la vaccination, amenant à conclure que la primo-insertion de virus place l'individu dans un état particulier vis-à-vis de l'antigène, état qui peut être mis en évidence aussi bien pendant qu'après l'évolution de la lésion vaccinale et aussi facilement à l'égard du virus tué que vivant.

(Faculté de Médecine, Laboratoire de Bactériologie.)

(1) Harry PLOTZ, *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 97, 55.

(2) Marcel MORTIER, Contribution à l'étude de l'allergie vaccinale. Thèse Paris, 1932. Le François, éditeur.

(Suite des communications au prochain numéro.)

Le Gérant : G. MASSON.